

UNIVERSITE DE CLERMONT

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1968

N° ~~7/68~~ 7/68 u

THESE

pour le

DOCTORAT DE PHARMACIE

présenté et soutenue publiquement

le VENDREDI 13 Décembre 1968

Guy JACQUET

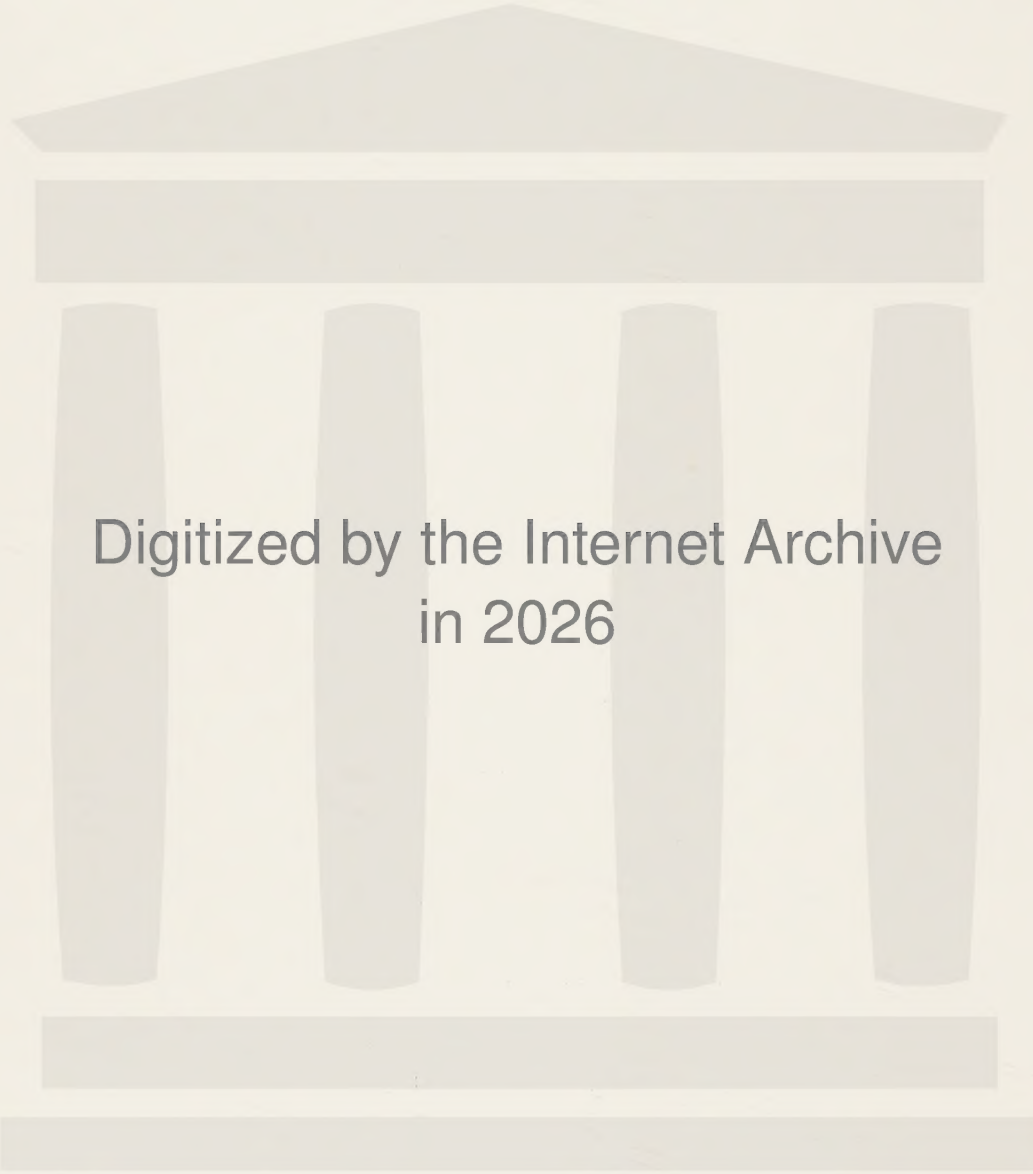
Pharmacien

Diplômé de l'I. P. I. M.

Né le 4 Septembre 1940

Contribution critique et expérimentale
à l'étude de la Glucuronyl - Transférase

Président : M. DASTUGUE, Professeur
Membres du Jury : M. BASTIDE, Professeur
M. BERGER, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546617_0024

Année 1968

THESE

pour le DOCTORAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le VENDREDI 13 DECEMBRE 1968

Guy JACQUET

Pharmacien

Diplômé de l' I.P.I.M.

Né le 4 Septembre 1940

Contribution critique et expérimentale
à l'étude de la Glucuronyl-Transférase

Président : M. DASTUGUE, Professeur

Membres du jury : M. BASTIDE, Professeur
M. BERGER, Professeur



Doyen : G. MEYNIEL

Assesseur : M. COULET

Doyen honoraire : M. CUVELIER

Directeur honoraire : M. MERLE

Professeurs honoraires : Mme BLANQUET, M. BUREAU
MM. GAUTHIER, POMME

I - PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BARRIER	Clinique Chirurgicale A
BASTIDE	Chimie biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique obstétricale
BERGER	Chimie analytique
BERGERON	Pathologie Médicale
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie Médicale
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie Pathologique
FEBVRE	Pharmacie Galénique
GRAS	Clinique Médicale
JACQUEMET	Technique chirurgicale
JALLUT	Séméiologie médicale
LATAIX	Pathologie chirurgicale
MERCIER	Anatomie
MEYNIEL	Biophysique médicale
MOLINA	Clinique Pneumo-phtisiologique
PETIT	Médecine légale et Médecine Sociale
POROT	Clinique neurologique et psychiatrique
POURRAT	Matière médicale
Mlle RAMPON	Thérapeutique
ROUHER	Clinique ophtalmologique
TERRASSE	Clinique médicale B
THIEBLOT	Physiologie
THOMAS	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
TRONCHE	Pharmacie chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie
VAURS	Bactériologie et Hygiène
WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile

II - PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM. CHAMPEIX	Médecine légale et Médecine du Travail
VIALLET	Electro-Radiologie

III - PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CLUZEL	Bactériologie
DUCHENE-MARULLAZ	Physiologie
GERMAIN	Clinique Chirurgicale B
MENUT	Pédiatrie et Puériculture

IV - MAITRE DE CONFERENCES AGREGES

M. BOSSY	Anatomie
Mlle CHATONIER	Chimie minérale et Minéralogie
Mme GAILLARD	Physique pharmaceutique
Mme MOINADE	Médecine générale et Thérapeutique
M. PIGNIDE	Médecine Générale
Mme POURRAT	Botanique
M. VENRIES DE LAGUILLAUMIE	Anatomie pathologique

V - AGREGES

MM. FOURRIER	Orthopédie
HOUDARD	Chirurgie Générale
JANNY	Neuro-Chirurgie
RENARD	Pneumo-Phtisiologie
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie

VI - DELEGUES DANS LES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

MM. JARREAU	Matière médicale
MALET	Histologie et embryologie
MARCHEIX	Médecine générale et Thérapeutique
PLAGNE	Cancérologie

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation. (Délibération en date du 6 Juin 1956).

A M A F A M I L L E

A T O U S M E S A M I S

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Biochimie Médicale,
Docteur en Médecine et en Pharmacie,
Docteur ès-Sciences,
Lauréat de l'Académie de Médecine,
et de l'Académie des Sciences,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Commandeur de la Santé Publique,
Officier des Palmes Académiques,
Officier de l'ordre National du Mérite.

Qui nous a fait l'honneur de nous
accueillir dans son Laboratoire, qui a sans cesse guidé nos re-
cherches tout en nous prodiguant ses conseils éclairés.

Qu'il veuille trouver ici l'expression
de notre respectueuse gratitude et la témoignage de notre profonde
reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur BASTIDE

Professeur de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie,
Pharmacien Chef des Hôpitaux,
Chevalier des Palmes Académiques.

Monsieur le Professeur J.A. BERGER

Professeur de Chimie Analytique,
Chevalier des Palmes Académiques.

Qui nous ont fait l'honneur de juger
cette thèse.

En témoignage de notre respectueuse
gratitude.

INTRODUCTION

Le transfert d'un résidu, D-glucose, d'un aglycone à un autre a été observé pour la première fois par RABATE en 1935 (113) dans ses travaux sur la glucosidase. En 1947, DOUDOROFF et HASSID (39) proposent le terme de "transglucosidase" pour les enzymes entrant dans le transfert des groupes glucosidiques. Mais c'est en 1954 que DUTTON et STOREY (58) démontrent, les premiers, l'existence dans les microsomes de foie, d'une enzyme qui catalyse le transfert de l'acide D-Glucuronique de l'acide Uridine Diphospho-Glucuronique, à l'ortho-amino-phénol, formant l'ortho-amino-phényl-glucuronide et l'Uridine Diphosphate. Ils nomment cette enzyme la GLUCURONYL TRANSFERASE.

Dans une première partie bibliographique, nous étudierons différents stades de la glucuroconjugaison, les propriétés, les techniques de dosage, la répartition de la Glucuronyl transférase et nous parlerons de son rôle dans l'espèce animale et dans l'espèce humaine.

Dans une deuxième partie expérimentale, nous avons étudié l'activité de cette enzyme dans différentes espèces animales, notamment chez la Souris, VIPERA ASPIS, TINCA Vulgaris, HELIX POMATIA, RANA ESCULENTE et COTHURNIX COTHURNIX JAPONICA.

Abréviations : U.D.P.G.A. - uridine diphospho glucuronide acide
U.D.P.G.T. ou G.T. = URIDINE DIPHOSPHO GLUCURONYL
TRANSFERASE
U.D.P. - uridine diphosphate.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux Laboratoires SPECIA qui nous ont confié le poste de collaborateur Technique dans le service de Monsieur le Professeur DASTUGUE.

Nos remerciements iront aussi à Monsieur le Professeur BERGER qui, durant trois ans, nous prodigua son enseignement et nous fit un grand plaisir en acceptant de juger ce modeste travail.

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer notre respectueuse gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur DASTUGUE, qui non seulement a inspiré le sujet de cette thèse, mais en a sans cesse guidé la réalisation ~~de~~ ses conseils éclairés, ainsi que nos meilleurs remerciements à Monsieur le Professeur BASTIDE dont l'amabilité et les profondes connaissances scientifiques ont grandement facilité notre tâche.

Nous tenons également à remercier Monsieur ARCHIMBAUD, Conservateur à la bibliothèque de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie, qui a facilité nos recherches bibliographiques ainsi que tous nos Maîtres de cette Faculté pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

P R E M I E R E P A R T I E

R E C H E R C H E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

CHAPITRE PREMIER

GENERALITES

L'existence de la GLUCURONYL TRANSFERASE a été démontrée pour la première fois par DUTTON et STOREY (56). Elle est appelée suivant les auteurs, TRANSGLUCURONYLASE, U.D.P. Glucuronyltransférase, Glucosyltransférase, et U.D.P. Glucuronate Glucuronyltransférase. La classification donnée dans " Recommendations of the Int. Union of Biochemistry on the Nomenclature and classification of Enzymes, 1964 divise les enzymes en six classes principales : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Dans cette liste, la G.T. a le numéro suivant : 2. 4. 1. 17.

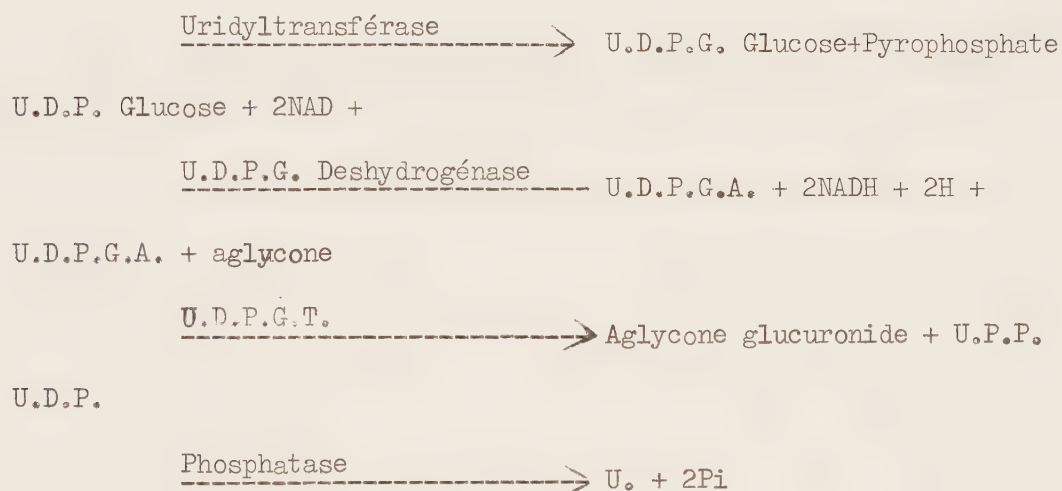
Chacun de ces chiffres a une signification et sert à l'identification.

- 1) Le Premier montre à laquelle des six divisions citées plus haut appartient l'enzyme particulier. Ici, 2. correspond au groupe des transférases.
- 2) Le deuxième chiffre indique la sous-classe. Pour les transférases, il donne la nature du groupe qui est transféré. Donc, 2.4. correspond au groupe des glycosyltransférases.
- 3) Le troisième chiffre est celui de la sous-sous-classe ; dans le cas présent il subdivise les types de groupes transférés. Donc 2.4.1. correspond au groupe des hexosyl-transférases.
- 4) Le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme dans sa sous-sous-classe, 2.4.1. 17 indiquant l'action sur les dérivés uridine diphosphates.

La Glucuronyltransférase catalyse le transfert de l'acide uronique vers un accepteur. Mais ce transfert ne se fait qu'après activation de l'acide glucuronique sous forme d'U.D.P.G.A.
(LATHE G.H. - (90).

D'après le schéma suivant :

- Glucose-1-phosphate + Uridine Triphosphate



C'est la glucuroconjugaison

(DUTTON 1961 (45)

C H A P I T R E II

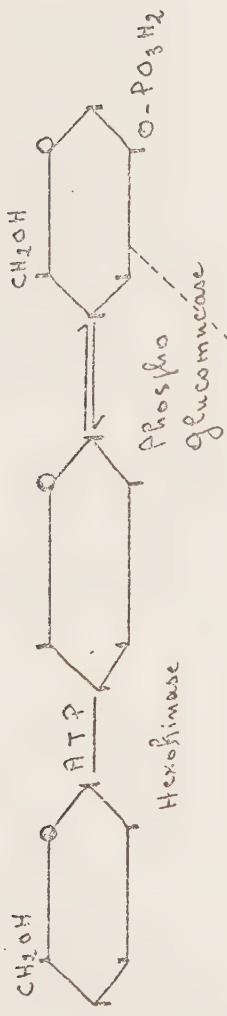
LIEU DE FORMATION DES CONJUGUES CLUCURONIQUES DANS L'ORGANISME

Selon les différents auteurs consultés, la glucuroconjugaison peut se faire dans le foie, les reins et le tractus gastrointestinal. Le point de départ de la réaction est l'acide glucuronique, dont la présence dans le foie a été confirmée par SMITH et MILLS (127) en 1954 et HURLBERT et POTTER (75). Cet acide a été découvert par SCHIEDEBERG et MEYER (124) dans l'hydrolyse de l'acide camphoglycuronique.

Il fait partie des acides uroniques qui jouent un rôle important dans la structure des polysaccharides : il est un constituant des tissus de protection et de soutien chez la plante, l'animal et l'homme.

Il dérive du métabolisme du glucose et accessoirement du galactose, sa source ultime pouvant être le glycogène, (FISCHAM (63) (STROMINGER, MAXWELL, AXELROD et KALCKAR (135), suivant un enchaînement de réactions que l'on peut schématiser ainsi : (voir schéma)

(MUNCH-PETERSEN, KALCKAR, CUTOLO et SMITH (104).



Glucose

Glucose-6-P

Glucose-1-P

UDP $\xrightarrow{\text{Uridyl Transférase}}$

$\text{P}_i + \text{UDP Glucose}$



DPN $\xrightarrow{\text{UDP G Dehydrogénase}}$



= donneur d'acide
glycémique par action
de la Glucumonyl Transfér

Enzyme de
transposition.

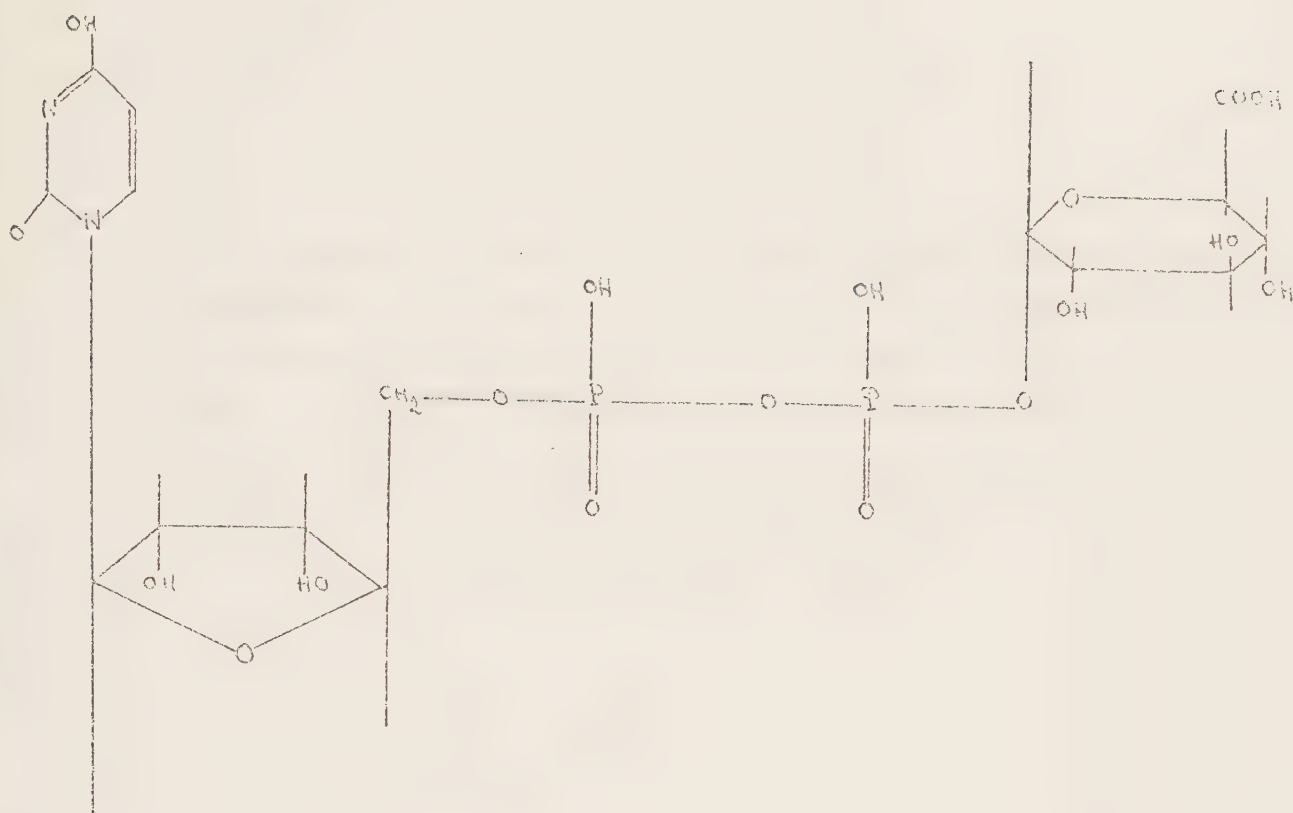
Galactose $\xrightarrow{\text{Galactokinase, ATP}}$ Galactose-1-P $\xrightarrow{\text{Uridyl Transférase, UDP}}$ UDP Galactose

Glycogène

Le deuxième stade de la réaction est la formation de l'acide Uridine Diphospho Glucuronique. Cofacteur, nécessaire à la synthèse des glucuronides comme donneur d'acide glucuronique à l'aglycone, fut détecté en 1951 par DUTTON et STOREY (56) et identifié en 1953 et 1954 par DUTTON et STOREY (57-58), DUTTON et SPENCER (53). Les mêmes auteurs, STOREY et DUTTON en 1955 (134) suggèrent que l'acide U.D.P.G. est une forme activée de l'acide glucuronique et qu'il est nécessaire dans tous les cas comme donneur de glucuronyl : FISHAM (64); (voir formule).

On admettait généralement que la synthèse des conjugués glucuroniques se faisait au niveau du foie. Cette hypothèse a pour base le travail d'EMBDEN (62). Or, PICK en 1894 (109) avait déjà fait des recherches qui n'étaient pas en faveur du foie comme lieu unique. Plus tard, SCHMID F. (117) montra que la formation d'acide glucuronique était encore possible malgré des lésions profondes du foie ; de même BRULE, GARBAM et AMER (22). Puis le rôle du rein, déjà mis en évidence par POHL (111) fut établi par SCHMID (118), LIPSCHITZ et BUIDING (95), KARUNAIRATNAM, KERR et LEWY (89), et par STOREY en 1950 (131). Plus près de nous, les auteurs ont étudié la formation d'acide glucuronique de l'acide U.D.P.G. dans le rein, GINSBURG (68), et dans le rein et le foie CONNEY (35), BOLLET, GOODWIN et BROWN (18). Il faut remarquer que l'enzyme serait absente de la zone médullaire du rein : DUTTON en 1959 (44) .

Toutefois, la synthèse des glucuronides ne se limite pas au foie et aux reins, mais a lieu aussi dans le tractus gastrointestinal d'après DUTTON en 1958 (43), STEVENSON et DUTTON 1960 - 1962 (129 - 130), SHIRAI en 1954 (125), HARTIALA en 1955 (73), SCHACHTER en 1959 (116), ZINI en 1952, DUTTON et STEVENSON en 1959 (54).



ACIDE URIDINE DIPHOSPHO GLUCOSIQUE

Nous nous limiterons donc à ces trois organes pour notre partie expérimentale, en remarquant que, dans ces trois cas, l'activité de l'enzyme est différente. Le rein de *Mucus Musculus* est moins riche en enzyme que le foie. Et bien que plus faible dans les homogénats gastrointestinaux, l'activité est supérieure aux préparations de duodénum, iléon et colon, dans les mêmes conditions.

CHAPITRE III

TECHNIQUES de DOSAGE

Principe de dosage :

Le principe général est le suivant : on effectue dans certaines conditions la glucuroconjugaison d'un substrat puis, on dose :

- soit le glucuronide formé
- soit la quantité de substrat non conjugué

Substrats :

Ils diffèrent suivant les auteurs consultés. On trouve :

- l'acide anthranilique : SHIRAI et OHKUBO (125)
- la bilirubine : GRODSKY et CARBONE (69)
- des stéroïdes : ELLIS et NEWCOMER (61)
- le paranitrophénol : HUTTUNEN et MIETTINEN (77)
: MIETTINEN et LESKINEN (101 - 102)
: POGELL et LELOIR (110)
- l'orthoaminophénol : WERDER et YAFFE (149)
: DUTTON et STOREY (56)

Dosages :

Nous passerons successivement en revue les techniques de :
CHIRAI et OHKUBO 1954 (125), GRODSKY et CARBONE 1958 (69),
METGE et OWEN 1964 (100), ELLIS et NEWCOMER 1964 (61), WERDER et
YAFFE 1966 (149), DUTTON et KO 1966 (60), et la méthode que nous
avons utilisée et qui est adaptée des auteurs : HUTTUNEN et MIETTINEN
1965 (77), MIETTINEN et LESKINEN 1962 (101), 1963 (102), POGELL
et LELOIR 1961 (110). Enfin, nous parlerons de la technique de COTTE,
MATHIEU et COLL. (36) qui s'applique à la biologie humaine.

I - TECHNIQUE DE SHIRAI ET DE OHKUBO. (125)

Les coupes sont mises à incuber dans un tampon, avec de l'acide anthranilique puis une extraction à l'ether donne deux fractions égales : fraction aqueuse. Elle est traitée par la soude une heure à 55°, ce qui donne une scission de l'acide anthranilique glycuconjugué ensuite, une extraction à l'ether prend l'acide anthranilique libre. fraction ether. Elle contient l'acide anthranilique qui ne s'est pas glycuconjugué.

L'acide anthranilique libéré de la phase aqueuse est dosé par chromatographie.

II - TECHNIQUE DE GRODSKY ET DE CARBONE. (69)

Les auteurs étudient la conversion, bilirubine en bilirubine directe pour démontrer que la glucuroconjugaison est incluse dans la synthèse de la bilirubine directe. L'homogénat reçoit de la bilirubine (en suspension dans une solution d'albumine) . On y ajoute un extrait de foie comme source d'acide U.D.P.G. et on fait une incubation de 45 minutes à 37°. On détermine la quantité de bilirubine-glucuronide formée, en mesurant l'accroissement du pigment direct dans le surnageant par la méthode de DUCCI et WATSON (40) .

Cette méthode est une modification de celle de VAN des BERG et SNAPPER (publiée en Allemagne).

Actuellement, GRODSKY et CARBONE effectuent une diazotation, puis passent au spectromètre (535 mμ) ce qui leur donne par calcul, la bilirubine directe ; une seconde formule mathématique fournit ensuite la bilirubine totale.

La production de bilirubine directe permet, peut-être, d'évaluer l'activité de la glucuronyltransférase.

$$\text{" bilirubine directe " } = \frac{\text{O.D.} \times 3,4 \times 1000}{11 \times 3,0}$$

$$\text{" bilirubine totale " } = \frac{\text{O.D.} \times 3,4 \times 1000}{5,5 \times 3,0}$$

III - TECHNIQUE de METGE et de OWEN (100)

Il utilisent : des macrohomogénats et microhomogénats.

1. Macrohomogénats :

Le produit d'incubation contient : bilirubine, U.D.P.G.A., homogénat hépatique.

La quantité de bilirubine conjuguée formée est estimée en mesurant la bilirubine directe après diazotation (légère modification de la méthode de GRODSKY et COLL.)

2. Microhomogénats :

Le principe est le même, mais la bilirubine est diazotée avec l'acide sulfanilique (à S³⁵) ; puis on sépare les pigments libres et conjugués par chromatographie sur papier, et on évalue la radioactivité de chaque zone.

IV - TECHNIQUE D'ELLIS et NEWCOMER (61)

- Immédiatement après le sacrifice de l'animal, les foies sont refroidis, pesés, et découpés en lames, et homogénéisés avec un Potter dans du KCl glacé. Un homogénat à 30 % (poids/volume) est préparé pour toutes les recherches. Ils utilisent aussi des préparations de microsomes.
- Les homogénats sont incubés dans les fioles de Warburg contenant 1 ml d'homogénats, 25 mg de glucose, 1/2 ml de tampon (POTTER, PARDER et LYLE) (112) , 1/2 ml d'U.D.P.G.A. (0,086 μ moles) et 1/2 ml d'une solution aqueuse contenant 0,14 μ moles de stéroïdes.

Les échantillons témoins, non incubés sont préparés comme ci-dessus mais l'U.D.P.G.A. y est remplacé par 0,5 ml d'eau distillée. Ces tubes témoins sont gardés dans un bain de glace pendant que les fioles de Warburg sont incubées 2 heures 1/2 à 37° sous oxygène.

Les stéroïdes et les colorants (dissous dans le méthanol) sont ajoutés aux tubes d'essai et soufflés jusqu'à dessiccation avec N₂ juste avant d'ajouter le tampon et les autres substrats.

On a deux tubes par essai : l'un incubé, l'autre conservé dans un bain de glace pour servir de témoin non incubé. Le tube incubé comprend : 0,1 ml d' U.D.P.G.A. (0,4 μ mole) , 0,55 ml de tampon Tris (ISSELBACHER, Mc CARTHY) (83) , et 1 ml de la préparation de microsomes. Le tube non incubé contient les solutions ci-dessus, sauf l' U.D.P.G.A. qui est remplacé par 1 ml d'eau distillée.

Après l'incubation, le contenu des fioles de WARBURG est quantitativement transféré aux tubes d'essais. Les tubes d'essais des séries non incubées, et, des séries incubées (pour l'étude des homogénats et des microsomes) sont placés dans l'eau bouillante pendant deux minutes.

Tous les tubes contenant des stéroïdes sont soumis à trois extractions avec 2,5 volumes de CHC 13. Les extraits chloroformés, en résultant, sont évaporés à sec, et les stéroïdes sont séparés des produits interférant par chromatographie sur colonne. Chaque échantillon (dans 5 ml de CHC 13) est ajouté à une colonne Florisil (NELSON et SAMUELS) (105), puis est ensuite passé au spectrophotomètre Beckmann avec des microcellules.

Les déterminations par la phénolphtaléine et par le paranitrophénol ont lieu après précipitation des protéines avec trois millilitres d'éthanol à 95 %. Après le retrait du précipité par centrifugation, des prélèvements de 1 ml sont faits dans chaque tube pour les essais qui sont faits en double. La méthode d'ISSELBACHER et Mc CARTHY (ci-dessus) a été utilisée pour les études au paranitrophénol. Les quantités de μ moles de substrats disparaissant après incubation, sont obtenues par différence entre les tubes incubés et non incubés.

La signification statistique des substrats disparaissant après incubation et extraction des stéroïdes après hydrolyse avec la B-glucuronidase, est précisée avec un essai "t". (SNEDCOR G.W) (128). La séparation (par électrophorèse) des conjugués stéroïdiens est faite au moyen de procédés classiques. (COHN et BOUDY) (34).

V - TECHNIQUE DE WERDER ET YAFFE. (149)

Cette technique est une modification de la méthode de GRODSKY et CARBONE. Le substrat est de la bilirubine, cristallisée et dissoute dans du CH C1 3, puis extraite avec de l'albumine.

On fait incuber 20 minutes à 37° : la solution de bilirubine, un homogénat hépatique, de l'U.D.P.G.A.

On centrifuge, et, on dilue le surnageant avec de l'eau. Puis on ajoute le réactif de diazotation, et on mesure la densité optique à 530 μ .

Le substrat peut être de l'orthoaminophénol. Dans ce cas, on développe la couleur par le procédé de LEWY et STOREY (94) puis on mesure la densité optique à 545 μ l'incubation étant ici de 30 minutes à 37 °.

VI - TECHNIQUE DE DUTTON ET STOREY. (56-60)

Ces auteurs ont modifié leur méthode à plusieurs reprises. En 1956, DUTTON (42) employait comme substrats les acides orthoamino-benzoïque et paraaminobenzoïque. Nous exposerons celle donnée en 1962 et reprise en 1966.

Le substrat est ici l'orthoaminophénol. Les essais sont faits :

A) Soit avec des homogénats

Mode opératoire : dans des fioles coniques de 25 ml on met :

Tampon tris	0,2	ml
Orthoaminophénol	0,2	ml
U.D.P.G.A.....	0,26	ml
Eau distillée.....QSP.....	3	ml
Homogénat.....	1	ml

La quantité de glucuronide formée est proportionnelle à la concentration de l'U.D.P.G.A. pourvu que l'orthoaminophénol soit en excès d'au moins cinq fois.

Les fioles sont agitées doucement à 37° pendant 20 minutes. Un égal volume de précipitant protéinique (mélange à volume égaux de phosphates 2 M et de trichloracétate 2 M) est alors ajouté. Le mélange est centrifugé et l'on prélève 4 ou 5 ml de surnageant. On ajoute : 1 ml de NO_2Na à 0,05%, on agite et on laisse reposer trois minutes. On ajoute 1 ml de sulfamate d'ammonium à 0,5 % ; agitation et repos pendant trois minutes. Enfin, on met 1 ml de dichlorhydrate de naphthyléthylène à 1 %. Et on développe la coloration, rose pourpre, par incubation à 25° pendant deux heures, de préférence à l'obscurité, car la lumière solaire pâlit la coloration et provoque un trouble.

La lecture se fait à 550 m μ . Si les conditions sont bonnes, un témoin contenant seulement l'orthoaminophénol serait jaune paille claire, sans qu'il apparaisse une coloration brune ou rouge en moins de deux heures, deux heures et demies.

Avec des cellules broyées, une centrifugation est habituellement nécessaire avant la coloration.

On peut économiser l'U.D.P.G.A. en réduisant tous les volumes au cinquième.

L'homogénat brut serait alors centrifugé légèrement avant de l'ajouter pour enlever les débris cellulaires.

Les homogénats de cortex rénal peuvent être traités comme les homogénats hépatiques ; ceux de muqueuse intestinale doivent être plus concentrés et filtrés à travers une mousseline avant d'être utilisés. Avec ces deux tissus, la destruction de l'U.D.P.G.A. est rapide, et une forte concentration du nucléotide ajouté est recommandée. L'incubation sous N_2 n'affecte pas la glucuronyltransférase et peut limiter les réactions latérales d'oxydation.

B) Soit avec des coupes cellulaires.

Mode opératoire :

Le processus est le même, mais l'agitation est prolongée pendant 60 à 90 minutes, avec passage de 5 % de CO_2 dans O_2 . La lecture se fait à 550 m μ .

On exprime généralement les résultats en μg de substrats conjugué par mg de tissu sec (pour les coupes) ou de tissus frais (pour les homogénats et les fractions cellulaires). Les courbes standard sont tracées au moyen de l'orthoaminophényl glucuronide biosynthétique pur.

Avec l'essai à petite échelle, on peut mesurer la formation d'environ 2 millimoles (057 μg) d'orthoaminophényl glucuronide.

L'incubation de tissus animaux avec de l' U.D.P. Glucose ne donne rien, mais les tissus végétaux donnent la coloration. Les préparations hépatiques bouillies d'U.D.P.G.A. et les homogénats tissulaires concentrés peuvent contenir des substances donnant la coloration ; il faut en faire la part au moyen de témoins convenables.

VII - TECHNIQUE adaptée de MIETTINEN et LESKINEN (101-102)

C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée tout au long de notre travail.

PRINCIPE

Le substrat employé est ici le para-nitrophénol. Le principe est l'obtention d'une diminution de coloration du paranitrophénol, suivant l'activité de l'enzyme opérant le transfert du radical glucuronyl de l' U.D.P.G.A. sur ce substrat en donnant le paranitriphényl glucuronide.

On a :



La méthode elle-même sera développée dans la partie expérimentale.

VIII - TECHNIQUE DE COTTE ET MATHIEU (36)

Cette méthode de dosage serait applicable en biologie clinique, ce qui n'est pas le cas des méthodes expérimentées sur l'animal dont nous venons de parler. Elles nécessitent en effet des quantités de foie de l'ordre de 50 mg à 1 g. et seule celle de la 4-umbelliférone (108) est utilisable sur des quantités minimales de foie, mais reste difficile à conduire. Pour ces auteurs, il semble préférable d'utiliser en biologie une méthode employant la bilirubine comme substrat, (63 - 92), mais les résultats actuels ne sont pas entièrement satisfaisants. (17 - 85). Toutefois, une méthode utilisant la bilirubine a été publiée (90) . Par ailleurs, suivant ces mêmes auteurs, en accord avec STOREY (communication personnelle), la technique à l'OAP manque de sensibilité pour des microprélèvements de foie humain. En définitive, ils retiennent donc la méthode au PNP (36) .

En conclusion si les problèmes de la spécificité enzymatique restent posés, cette technique demeure applicable en biologie sur des ponctions de biopsies de l'ordre de 5 à 10 mg.

CHAPITRE IV

ROLE DE LA GLUCURONYL TRANSFERASE

Dès 1921, CAILLE (24), puis CHIRAY et CAILLE (31) ont étudié les problèmes du devenir de l'acide glycuronique et son rôle dans la formation des conjugués glycuroniques. En 1960, NESSMAN (106) s'est penché sur l'élimination de l'acide glycuronique et sur la glycuroconjugaison chez le nouveau né, et a parlé de maturité enzymatique hépatique dans laquelle la Glucuronyl Transférase aurait un rôle important. Comme nous l'avons signalé, certains auteurs ont choisi la bilirubine comme substrat pour étudier la glucuronidation. (GRODSKY et CARBONE, (69), METGE et OWEN (100), MENKEN BARRET et BERLIN (99).

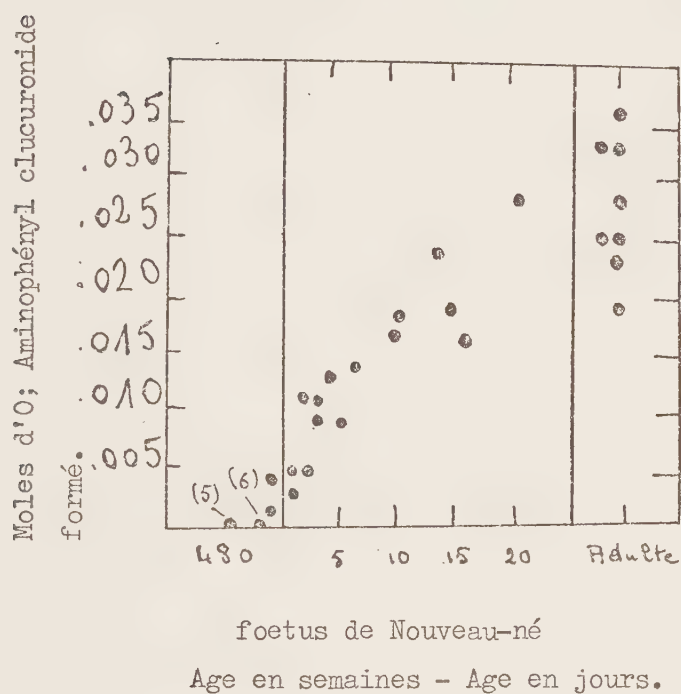
BILLING, COLE et LATHE en 1954, (15) puis SCHMID en 1956 et 1957 (119 - 120) ont montré que la conversion de la bilirubine indirecte en bilirubine directe s'effectue dans le foie par glucuroconjugaison, et que la Glucuronyl Transférase y joue un rôle important.

SCHMID, HAMMAKER et AXELROD (122) se sont penchés sur la formation enzymatique de la bilirubine en glucuronide, ainsi que BILLING, MAGGIORE et CARTER (16) DUTTON en 1959 (44) SCHMID R. et LESTER R. en 1968 (123). BROWN et ZUELDER (21) étudiant le développement néonatal du système de glucuroconjugaison, signalèrent une déficience en Glucuronyl Transférase chez le cobaye, déficience complète pour l'embryon et presque totale chez le nouveau-né (Table. I) et, VEST (147) a montré la relation qui existe dans ce cas avec la pathogénèse de l'ictère néonatal.

ARIAS, JOHNSON et WOLFON (6) ont établi une relation entre une jaunisse scholurique non hémolytique et la déficience de l'activité de la Glucuronyl Transférase hépatique.

Pour SCHMID, AXELROD, HAMMAKER et SWARM (121) puis CARBONE et GRODSKY (25) le défaut de la formation des phénylglucuronides arrive chez les rats et les humains ayant une jaunisse congénitale.

De même, JOHNSON, SARMIENTOFF, BLANC et DAY en 1959 (80) , JOHNSON et COLL. en 1961, (81) LATHE et WALKER en 1957 (84) montrèrent la déficience en Glucuronyl Transférase chez les rats ayant un ictère.



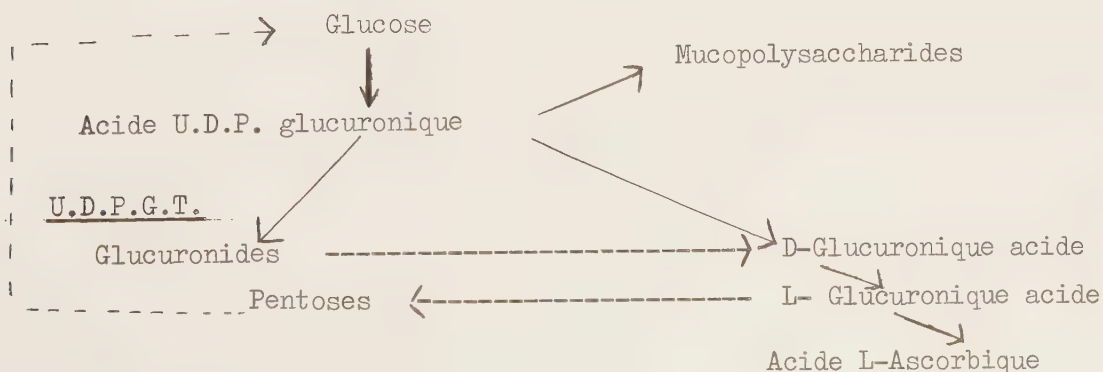
Tabl. I : Comparaison du montant d'o.a. phénylglucuronide formé par le foie de cobaye foetal, nouveau-né et adulte (BROWN et ZUENDER) (19).

En 1959, JERVIS (85) a relié le défaut de Glucuronyl Transférase et les troubles décrits dans l'hyperbilirubinémie constitutionnelle non hémolytique. Puis ARIAS en 1960 (2) étudia " les bases chimiques de l'ictère " et montra, également l'importance de la Glucuronyl Transférase.

Nous voyons donc que les ictères de la période néonatale seraient liés à une accumulation de bilirubine libre, non conjuguée. (CHEVREL et CHEVREL J.P. (29) . Bien plus, ces mêmes auteurs dans " l'ictère néonatal lié à l'allaitement maternel " ont mis en évidence, après ARIAS (3), la présence dans le lait maternel d'une substance inhibitrice de la Glucuronyl Transférase, substance identifiée comme étant le prégane 3 - α 20 B Diol. Enfin, pour ARIAS, GARTNER et SEIFTER (4 - 5), dans tous les cas, le lait maternel inhibait, in vitro, l'activité de la Glucuronyl Transférase, tandis que en l'absence d'hyperbilirubinémie chez les enfants, le lait maternel n'inhibait pas l'enzyme. Signalons encore deux maladies de Ciriggler et celle de Gilbert (ARIAS et LONDON) (7) .

DUTTON en 1961 (45) a décrit qu'une absence de Glucuronyl Transférase ne semble pas compatible avec la vie adulte.

BURNS (23), puis TOUSTER, HOLLMAN et SHUMAKER (140) ont montré que la Glucuronyl Transférase entraine dans la production de l'acide ascorbique :



AXELROD, INSCOE et TOMKINS (10) étudiant la synthèse des conjugués d'acide N-glucosyluronique ont émis l'hypothèse qu'il n'y aurait qu'une enzyme catalysant le transfert de l'acide glucuronique de l'U.D.P.G.A. sur des accepteurs phénoliques, alcooliques, carboxyliques et sur des accepteurs amines, ce qui a été contesté par la suite, comme nous le verrons.

Il faut par ailleurs remarquer que la conjugaison avec l'U.D.P.G.A. constitue, sous l'action de la Glucuronyl transférase, la voie métabolique principale qui est empruntée par de nombreux composés endogènes ou exogènes tels que : la bilirubine, les hormones stéroïdes, les salicylates, les bishydroxycoumarines, la morphine et ses congénères, l'aminophénol, le camphre, l'acide benzoïque. (ADAMSONS et JOELSON (1), (SCHUSTER (126) , (FREDOUX) (66), (CHEMANA, BAULIEU, CREPY et FAYLE (28), (ISSELBACHER et AXELROD (82), (AXELROD et INSCOE (9) , (CHILD, SIDBURY (30).

Ceci nous amène à parler des dangers de certaines thérapeutiques pour le nouveau-né (CHASSAGNE, GEORGES et JANET (27). Ainsi, le tribromoéthanol est fortement dépresseur ; or, cet hypnotique s'élimine après conjugaison glucuronique que le nouveau-né est incapable de réaliser, d'où son évacuation très lente et les dangers qui en résultent. De même pour le chlor...amphénicol ou la novobiocine qui induit un ictère à bilirubine indirecte au cours d'un traitement prolongé (CHAPTAL, JEAN et BONNET (26), (LOKIETZ, DOWBEN et YIYUNG HSIA D. (96) ou encore la morphine (TAKEMORI (136), et GLOWACKI (137).

BASTIDE et DASTUGUE (14) se sont également penchés sur les métabolismes médicamenteux et les activités enzymatiques qui y jouent un rôle. Pour prévenir chez le nouveau-né les troubles de la coagulation sanguine, les vitamines K1, K2 ou leurs dérivés ont été administrés à la mère. Ces auteurs ont souligné que ces dérivés sont conjugués par glucuroconjugaison, comme l'est la bilirubine avant d'être excrétée. Ainsi chez le prématuré, il y a un système de glucuronyltransférase qui travaille en compétition pour la vitamine K et la bilirubine. La bilirubine non métabolisée, concentrée dans les cellules nerveuses, va donner l'ictère hémolytique. Cependant, BARBARA (12) concluait que l'hyperbilirubinémie chez les prématurés après de fortes doses de dérivés hydro-solubles de la vitamine K n'était probablement pas due à un effet inhibiteur sur la glucuronyl Transférase , mais peut-être à une hémolyse.

En conclusion, nous voyons que le rôle de la glucuronyl Transférase est très important et tient une place de premier plan dans l'immaturité enzymatique du nouveau-né. (ROUQUES L. (115) , DASTUGUE et GREZE (38), et dans de nombreux désordres hépatiques. (HASUTAKE et YAMAMOTO 1963 (151)).

CHAPITRE V

REPARTITION DE LA GLUCURONYL TRANSFERASE

1 - VEGETAUX

Nous signalerons tout d'abord que, en 1949, MIWA, TAKANO et FURUTANI (103), confirmant les travaux de RABATE (113) sur la biochimie des SALICACEES, et, ceux d'AXELROD (8), parlent d'une enzyme qu'ils nomment la "glucotransférase", et dont l'action nous est apparue, dans son mécanisme proche de celle de la glucuronyl transférase. En effet, la glucotransférase catalyse le transfert du glucose, ceci en corrélation avec une autre enzyme la B-Glucosidase. De même, la Glucuronyl Transférase catalyse un transfert au cours d'une réaction dans laquelle une autre enzyme serait également en jeu, la B - Glucuronidase. Dans les deux cas, le paranitrophénol pouvait être utilisé comme substrat.

Nous n'avons trouvé aucun texte traitant de la glucuronyl transférase chez les végétaux. Mais, une situation, semblable à celle de certains animaux (insectes) existe dans les plantes. Des phénols étrangers sont conjugués avec le glucose de l'U.D.P. glucose (HUTCHINSON (76) et, alors que la plante peut former un glucuronide endogène de l'U.D.P.G.A., les aglycones étrangers ne sont pas traités de cette façon (MARSH (98)).

11 - ANIMAUX

A - Invertébrés

La Glucuronyl Transférase est absente chez les insectes, et, une U.D.P. glucose transglucosylase agit plutôt en formant des glucuronides de composés étranger (DUTTON et DUNCAN (49) (TRIVELLONI (142)).

B - Vertébrés

C'est essentiellement sur les vertébrés que les différents auteurs ont étudié la Glucuronyl transférase. L'enzyme est située dans les microsomes (HALAÇ et FRANK (71), ou associée aux microsomes.

a) BATRACIENS

MAICKEL, JONDORF et BRODIE (97) opèrent sur Ranapipiens. Ils montrent que ces animaux excrètent 90-95 % d'une dose de 5 mg de phénols (phénolphtaléine, 8-hydroxyquinoléine, naphtol, ou para-nitrophénol) en composés conjugués dans les 48 heures suivant l'administration parentérale. Si les animaux étaient nourris de glucose immédiatement avant l'administration des phénols, ou si le glucose était ajouté au milieu contenant l'animal pendant le temps nécessaire au métabolisme du phénol, le taux final des composés était de 4/1 (glucuronide/sulfate). Si les animaux n'étaient pas nourris avec du Glucose, les phénols étaient alors excrétés avec le sulfate dans la proportion de 1/5 (glucuronide/sulfate). Opérant sur Bufo marinus, ils montrèrent que cet animal pouvait conjuguer les phénols en glucuronides et sulfates.

Pour SCHMID et LESTER (123), la grenouille (Ranapipiens) possède une activité U.D.P.G.T. hépatique mais n'excrète pas la bilirubine comme un glucuronide. Et, l' U.D.P.G.T. est présente dans le foie de grenouille adulte (DUTTON et GREIG (50) mais non dans celui des têtards ou de tous les amphibiens aquatiques.

b) POISSONS

DUTTON et MONTGOMERY (52) ont étendu l'étude de la glucuro-conjugaison à la truite : Salmo-fario. D'après ces auteurs, le foie de truite contient un nucléotide se comportant comme l'U.D.P.G.A. chromatographiquement (STOREY et DUTTON 1955 (134) et dans le transfert de glucuronyl.

Ils montrent que des extraits bouillis de foie de truite ont 50 à 80 pour cent d'activité des préparations similaires de cobayes, et signalent aussi l'U.D.P.G.A. chez l'Oncorhynchus tshawtscha marine et Gadus callarias. Pour eux, l'U.D.P. transglucuronylase de truite était semblable à l'enzyme des mammifères en pH optimal, mais moins stable : action optima à 18-24° et diminution rapide à 37° après dix minutes. Mais la comparaison est difficile car les tissus de poissons conjuguent beaucoup moins, et demandent des homogénats plus concentrés. Pour MAICKEL, JONDORF et BRODIE (97) certains poissons (perche et poisson rouge) sont incapables de former des glucuronides et des sulfates. Et, des doses de phénols même très basses (0, 5 mg/kg) étaient souvent mortelles. Des poissons placés dans des solutions de 10 parties pour mille de phénol absorbaient suffisamment de phénol pour que cela soit toxique en 4 à 8 heures. TSUYUKI, VIOLET M. CHANG et IDLER (143) étudièrent Oncorhynchus tshawytscha et comparèrent leurs résultats avec ceux obtenus par d'autres chercheurs.

c) REPTILES

BRODIE et MAICKEL (20) ont trouvé une activité glucuronyl transférase chez certains reptiles en particulier l'alligator.

e) OISEAUX

VIVIAN KO et NEMETH (148) ont étudié la Glucuronyl transférase chez des embryons de poulets de différents âges. Ils ont montré que la synthèse des glucuronides tombait à zéro juste avant l'éclosion et augmentait rapidement jusqu'à des valeurs élevées après la naissance.

DUTTON et KO (60) ont démontré que la synthèse de l'orthoaminophénol glucuronide et de l'U.D.P.G.A., chez Gallus Gallus, suit la voie observée chez les mammifères. L'organe principal de la formation est le foie avec une activité moindre pour le rein, le tractus gastro-intestinal et peut-être la peau.

Avec différents substrats, la contribution des organes peut changer sensiblement ; ainsi, WOLFE et HUANG (150) ont trouvé seulement des traces d'aminobenzoate glucuronides formés par des coupes de rein de poulet. NEWCOMER et HENINGER (107) ont rapporté l'activité de l'U.D.P.G.T. envers certains stéroïdes à la glande surrénale de poulet.

Toujours chez Gallus Gallus, DUTTON et KO (60) ont étudié le développement de la glucuroconjugaison durant le cours de la croissance.

DUTTON en 1961 et 1963 (46 - 47 - 48) et DUTTON, STEVENSON et BULLOCK (55) ont travaillé sur la formation de glucuronides chez le poulet et l'embryon de poulet, et ont comparé les résultats obtenus avec ceux donnés par des préparations similaires de mammifères. Dans l'embryon, l'activité de la Glucuronyl Transférase hépatique est observable à 8 jours d'incubation ; elle augmente lentement à quelques jours de l'éclosion, diminue, puis remonte très rapidement après la naissance jusqu'à des valeurs supérieures à celles des adultes.

Pour BALDWIN, ROBINSON et WILLIAMS (11) la formation de glucuronides ether et ester de composés étrangers est une importante méthode de détoxication chez la poule adulte et a lieu dans le foie de ces espèces ainsi que chez le pigeon (Columbia livia) et l'étourneau (Sturnus vulgaris) par la même voie que chez les mammifères.

Suivant WOLFE et HUANG (150) les glucuronides peuvent être formés dans les oeufs après seulement six jours d'incubation.

d) MAMMIFERES..

La synthèse des glucuronides est absente des coupes de foie de chat (HARTIALA 1955 (73) DUTTON 1961 (a) (45) (BORRELL (19). L'U.D.P.G.A. serait présente dans le foie de chat en même temps qu'un facteur inhibiteur thermolabile empêchant la synthèse de l'orthoamino-phényl glucuronide. La plupart des auteurs ont étudié la glucuroconjugaison chez les mammifères. KARUNAIRATNAM, KERR et LEWY (89) ont montré que l'enzyme responsable de la synthèse des glucuronides serait présente dans le foie et en petite quantité dans le rein. Le taux pratiquement nul à la naissance, atteindrait son maximum vers quatre ou cinq semaines (RITCHER 1961 (114). FISHAM et GREEN (65) ont par ailleurs signalé une différence entre le système responsable de cette synthèse et de la glucuronidase.

ELLIS et NEWCOMER (61) ont recherché l'activité de la Glucuronyl Transférase chez le rat, le chien et le mouton, et ils ont comparé la capacité du système glucuronyl-transférase dans le tissu hépatique d'un ruminant avec celle d'un non ruminant.

HUTTUNEN et MIETTINEN (77) ont étudié les variations de la glucuronidation chez des rats d'âge et d'espèces différents.

En 1962 MIETTINEN et LESKINEN (101) ont montré la présence de la Glucuronyl Transférase dans le foie, le rein et l'intestin, et, les effets de l'EDTA. Ces mêmes auteurs, en 1963, ont utilisé des rats à jeun et des rats nourris normalement.

STEVENSON et DUTTON (130) se sont livrés à des expériences sur le cobaye, la souris et le lapin ; de même, DUTTON et GREIG (50). STOREY (132) a étudié la synthèse des glucuronides dans les coupes de foie de souris adultes.

Enfin, INSCOE et AXELROD en 1959 (73) ont signalé une différence dans l'activité de la Glucuronyl Transférase chez les rats mâles et chez les femelles. Cette diminution de la synthèse chez les femelles pourrait être due à une substance inhibitrice ou, à un taux supérieur en enzyme hydrolysant le glucuronide, la B- glucuronidase. Leurs résultats sont résumés dans le tableau 2.

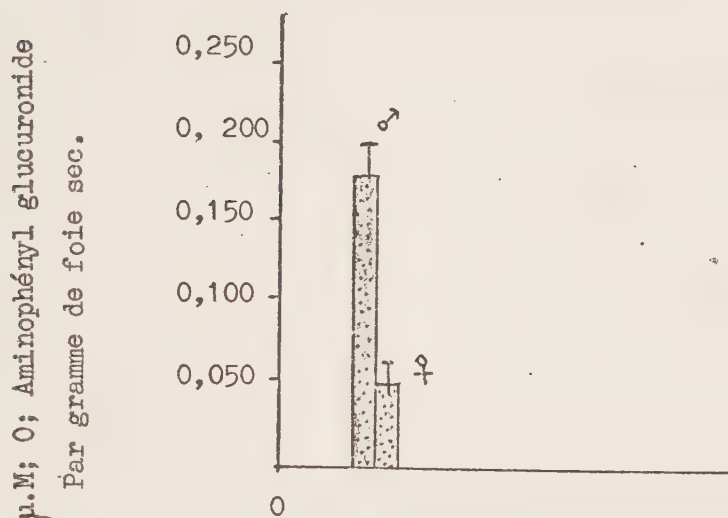


Tableau 2 : Tableau donné par INSCOE et AXELROD. (73).

CHAPITRE VI

NATURE ET PROPRIETES DE LA GLUCURONYL TRANSFERASE

Bien que depuis les premiers travaux de DUTTON et STOREY (56), de nombreux auteurs aient étudié la Glucuronyl Transférase, sa constitution n'a pas encore été élucidée.

Nous passerons donc directement à l'étude de quelques unes de ses propriétés.

1 - STABILITE

Comme nous l'avons nous mêmes remarqué, la G.T. est une enzyme très peu stable. Déjà en 1954, DUTTON et STOREY (58) ont recommandé de recueillir les organes rapidement à basse température pour les transporter dans de la glace au Laboratoire. Ils ont fait remarquer qu'un délai, même de quelques minutes, diminuait très sensiblement l'activité (Tableau 3).

HALAC et REFF (72) en 1967, ont signalé qu'une préparation microsomale perdait 20 p. cent de son activité envers le paranitrophénol et la bilirubine en 6 jours, et 70 p. cent en 15 jours, tandis que l'enzyme solubilisée par le déoxycholate n'avait que 50 p. cent d'activité.

2 - INFLUENCE DU pH

Le pH optimum pour la synthèse des glucuronides varie suivant les auteurs entre 7,5 et 8,0. DUTTON et STOREY (59) ont fixé ce pH à 7,6 et ont étudié l'influence de ses variations. (cf. courbe). STEVENSON et DUTTON (129) ont donné un pH compris entre 7 et 8;

Pour HALAC et REFF (72), le pH optimum pour la réaction avec le paranitrophénol et la bilirubine est compris entre 7.8 et 8.0

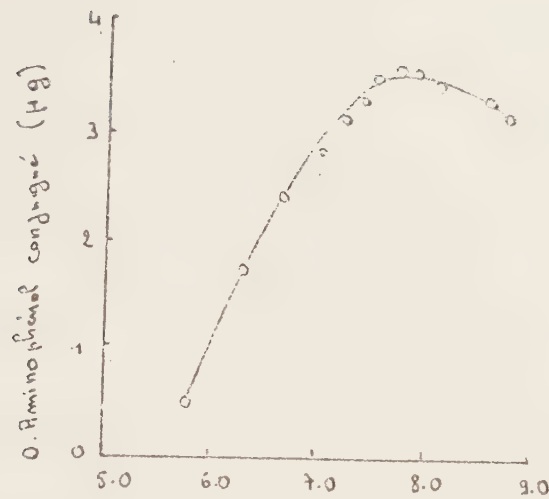


Tableau 3: Influence du pH sur la synthèse des glucuronides.
DUTTON et STOREY (52).

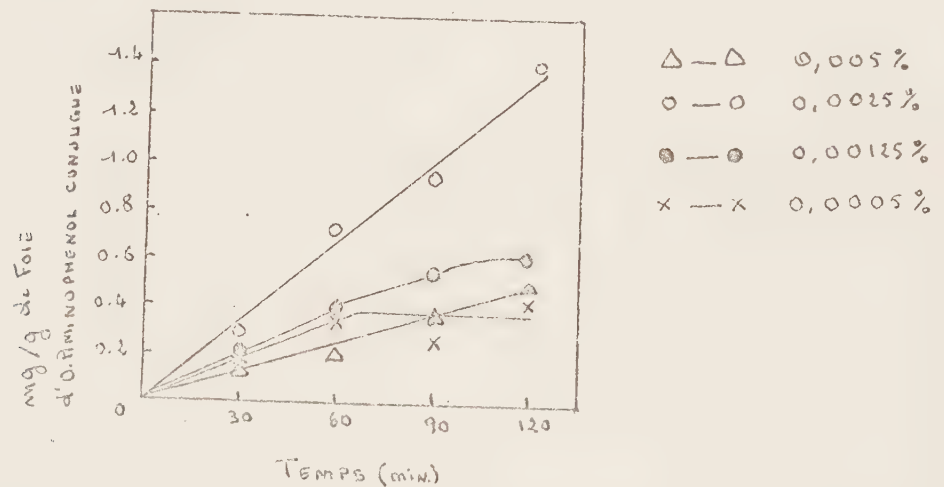


Tableau 4: Influence de la concentration en orthoaminophénol sur la synthèse des glucuronides par le foie de souris. LEWY et STOREY (85).

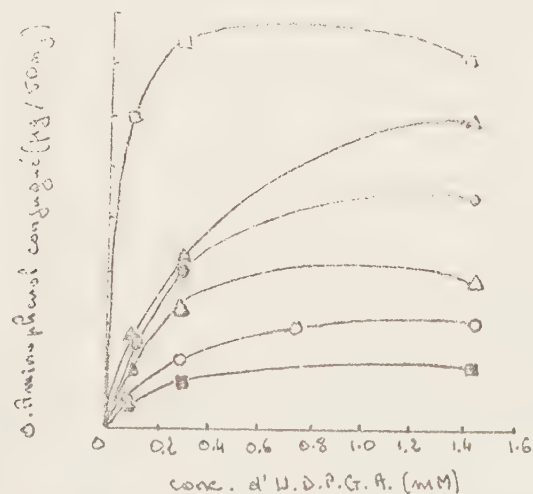


Tableau 5: Influence de la concentration en U.D.P.G.A. sur la synthèse de l'orthoaminophényl glucuronide par des homogénats de tissus de cobaye. (120 et 100).

- muqueuse gastrique adulte
- estomac de foetus
- ▲ rein adulte
- ▲ rein de foetus
- ▣ foie adulte
- foie de foetus

Les valeurs doivent être multipliées par 10 pour les foies adultes et de foetus, et pour le rein adulte. L'age des foetus est de 6 à 8 semaines.

3 - TEMPS D'INCUBATION

STEVENSON et DUTTON en 1962 (130) ont montré qu'une incubation de trente minutes était suffisante, car il n'y avait pas d'augmentation sensible des taux de glucuronides formés en prolongeant la durée d'incubation.

HUTTUNEN et MIETTINEN (77) ont également proposé une incubation de trente minutes.

Il faut cependant noter que HALAC et REFF (72) utilisant des extraits activés n'incubaient que 5 à 10 minutes. Toutefois, ils faisaient remarquer que, dans ce cas, les résultats obtenus par HUTTUNEN et MIETTINEN (77) étaient en accord avec les leurs.

4 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

LEWY et STOREY (94) ont étudié l'influence de la concentration en substrat sur la synthèse des glucuronides. Prenant l'orthoaminophénol comme substrat, ils ont montré que le taux maximum de glucuronides était atteint pour une concentration de 0,0025 %. (cf. courbe).

5 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN U.D.P.G.A.

STEVENSON et DUTTON en 1962 (130) ont indiqué l'influence de la concentration en U.D.P.G.A. Selon ces auteurs, la saturation avec cet acide est d'une part très coûteuse, et, l'enzyme étant impure, les résultats obtenus sont alors variables ; comme le montrent POGELL et LELOIR (110). Mais surtout, des différences existent entre les organes adultes, et les organes de fœtus également. (cf. courbe).

6 - INFLUENCE DU SEXE

D'après INSCOE et AXELROD (73) l'examen de l'activité de la glucuronyl transférase chez des rats adultes montrait que les microsomes de mâles étaient environ 4 fois plus actifs que les microsomes de femelles. (cf. courbe). Ces auteurs envisageaient que la différence puisse être expliquée par une substance inhibitrice présente dans le foie des femelles, ou par une quantité plus grande en enzyme hydrolysant le glucuronide. La B - glucuronidase. Mais, l'addition au mélange d'incubation de saccharate acide de potassium à une concentration connue pour inhiber la B - glucuronidase, ne donnait pas d'élévation significative de l'activité enzymatique chez les femelles ; ce qui prouvait que les différences en B - glucuronidase n'expliquaient pas les différences de l'action de la glucuronyl Transférase. Enfin, l'addition de microsomes d'animaux femelles à des microsomes n'avait pas d'effet sur l'action des préparations enzymatiques de rats mâles.

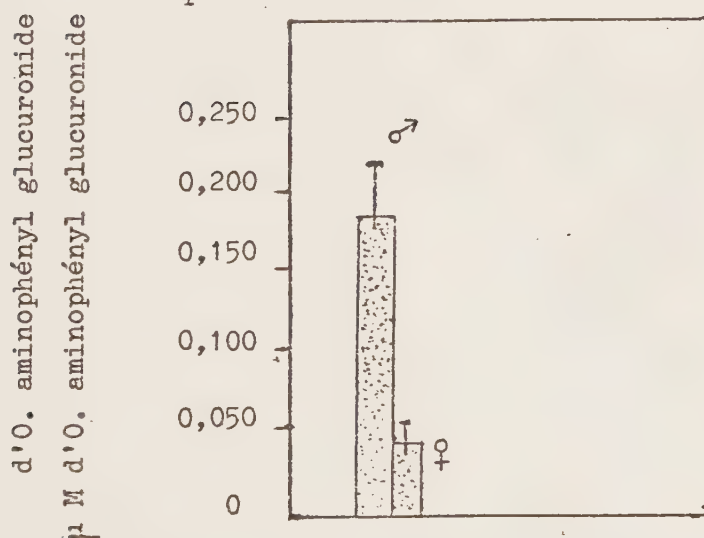


Tableau 6 : donné par INSCOE et AXELROD (73).

Les microsomes de foie de cobayes et de souris ne donnaient pas de différences suivant le sexe.

7 - EFFECTEURS DE LA REACTION

1 - Glucides

D'après STEVENSON et DUTTON (130), le glucose augmenterait la formation d'orthoaminophényl glucuronide dans le rein de cobaye d'environ 34%. Dans le rein et la muqueuse gastrique, le glucuronate aurait le même effet à un taux moins élevé, et le glucurone, inhibant les coupes de rein, aurait un effet sur la muqueuse gastrique (voir tableau 7).

II - Ions métalliques

Toujours d'après STEVENSON et DUTTON (130), une stimulation était observée avec les ions Mg^{2+} à 0.01M ; 35% pour les préparations de muqueuse gastrique de lapin et 10 % pour celles de rein de cobaye. Par contre, une inhibition était produite par Ca^{2+} à 0.017M et avec 0.1M de Mg^{2+} . Dans les coupes de reins de cobaye, les ions SO_4^{2-} diminuaient la quantité d'orthoaminophényl glucuronide ainsi que dans la muqueuse gastrique (voir tableau 7).

TISSUS	Nº ADDITION	+ GLUCOSE	+ GLUCURONATE	+ GLUCURONE	+ SULPHATE
Rein de Souris	6.3 (6,5,7,7.3)	-	-	-	-
Rein de Cobaye	12.0,16.5,12.5, 13.5,14.0	15.0,20.7,21.5 15.5,-	-, -, 13.5,16.5	7.5,-,9.4,-,-	-, -, -, 10.4
Estomac de Souris	1.4 (6,0.9,1.8)	4.5,6.0,9.0	2.7	1.5	-
Estomac de Cobaye	1.2 (11,0.8,1.5)	1.5,1.6,2.1, 2.9,3.3	-	-	-
Portions lambeaux de muqueuses stoma- cales de cobaye	1.9 (14,1.1,2.5) 1.9	3.0 (14,2.4,4.6) -	22.4 (7,1.7,3.1) -	2.0 (6,1.8,2.7) -	- 1.5

III - Adénosine triphosphate, Uridine diphosphate N-acetyl-glucosamine et acide éthylènediaminetetra-acétique

L'ATP augmente la synthèse dans les homogénats de peau en inhibant la destruction du nucléotide par la pyrophosphatase (STEVENSON et DUTTON 1960 (129)).

L'ATP, l'UDP-N-acetylglucosamine et l'EDTA agit de même dans diverses préparations de foie. (POGELL et LELOIR 1961 (110)). Les effets sont négligeables sur le foie de cobaye adulte.

En 1962, MIETTINEN et LESKINEN (102) ont montré que l'EDTA inhibait l'U.D.P.G.A. pyrophosphatase non seulement dans le foie, mais aussi dans le rein et l'intestin ; ceci était prouvé par la diminution du phosphate inorganique de l'acide U.D.P. et par l'augmentation simultanée de la glucuronidation. Toutefois, chez les rats femelles, la glucuronidation n'était augmentée que dans les reins et l'intestin. De plus, l'EDTA pouvait parfois inhiber l'enzyme. En 1963 (101) ces mêmes auteurs faisaient remarquer que la glucuronidation avec l'EDTA donnait l'activité maximale pour l'U.D.P.G.T.

m. μ Moles de P. nitrophénol conjugué
par gramme de foie sec.

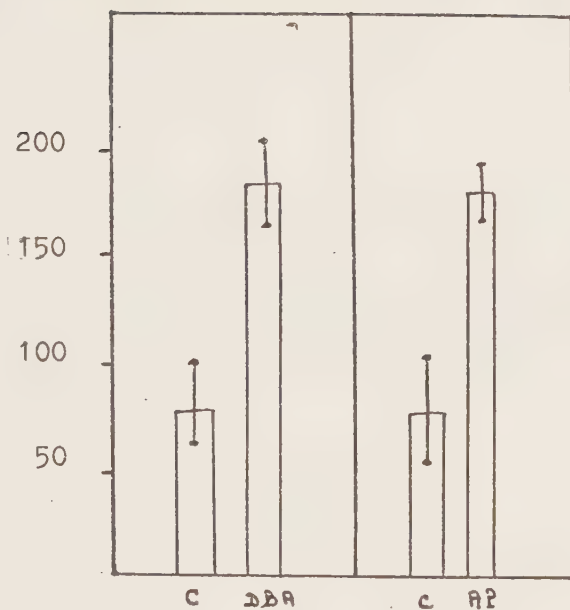


Tableau 8 : Courbe donnée par TOUSTER et coll. (130 et 131)

M. d'O. Aminophényl glucuronide
par gramme de foie sec.

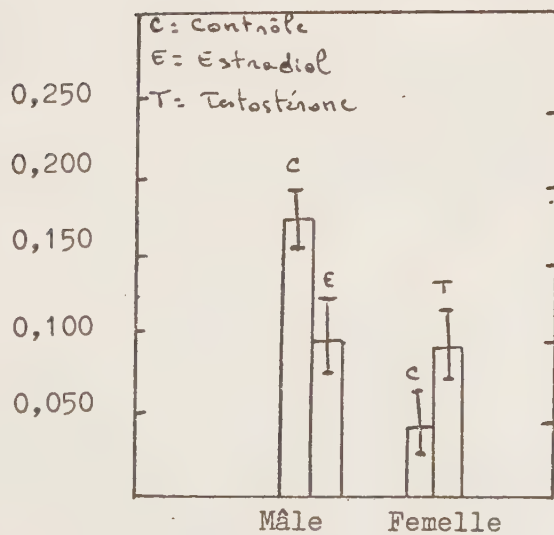


Tableau 9 : Effet des Hormones sexuelles, in vitro. (INSCOE et AXELROD) (73).

IV - Dibenzanthracène et aminopyrine

TOUSTER et HOLLMANN (130-131) ont étudié les effets de l'aminopyrine et du 1,2,5,6-dibenzanthracène qui produisent une agumentation importante de la conjugaison du para nitrophénol.

V - Hormones sexuelles

Le traitement chronique de rats mâles avec de l'estradiol réduisait l'activité de la glucuronyl transférase de plus de la moitié, tandis que l'administration répétée de testostérone à des rats femelles l'élevait de deux fois la normale. (cf. courbe.) (INSCOE et AXELROD (73)).

L'addition des hormones sexuelles directement aux mélanges d'incubation n'avait pas d'effet.

VI - Benzopyrène

D'après INSCOE et AXELROD (73), le traitement de rats mâles par le benzopyrène élevait l'activité de la glucuronyl transférase d'environ 40 % (cf. courbe). L'administration de benzopyrène à des rats femelles qui avaient été traités, de façon chronique par la testostérone augmentait l'action de l'enzyme de plus de 500 pour cent (cf. courbe) (Tableaux 10 et 11)

L'augmentation de la formation d'ortho aminophényl glucuronide, sous l'action du benzopyrène, était également significative chez les animaux à l'état néo-natal. (cf. courbe). Des rats femelles traitées chaque jour pendant une semaine avant terme subissaient une élévation de leur possibilité à conjuguer l'o.a.phénol, mais il n'y avait pas d'effet à la naissance.

VII - Méthylcholanthrène

La glucuronyl transférase était aussi stimulée par le 3-méthylcholanthrène. (INSCOE et AXELROD (79)). Des rats de 20 à 22 jours, de race Holtzman, traités par ce corps, présentaient une augmentation de l'activité de la glucuronyl transférase de l'ordre de 120 % alors que la même quantité de benzopyrène élevait l'action de l'enzyme de 200 %. (cf. tableau 12).

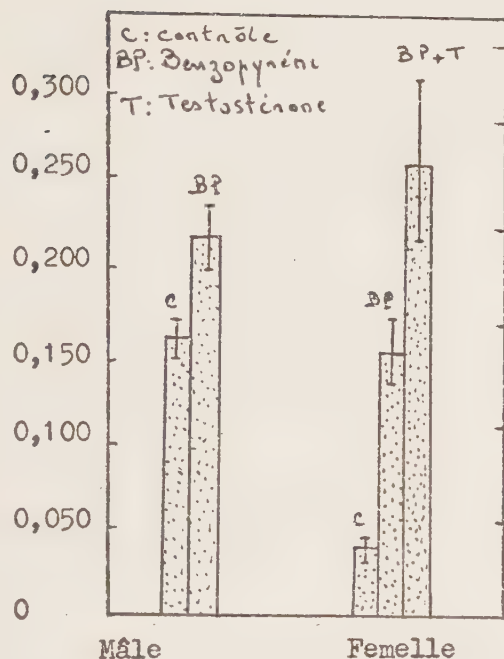
Tableau 12 : Stimulation de la glucuronyl transférase par le 3-méthylcholanthrène

Groupe	uM O.Aminophényl glucuronide formé par gr. de foie sec
Contrôle	0.091 ⁺ 0.015
3-méthylcholanthrène	0.205 ⁺ 0.052

VIII - Effet du Stresse

Il avait été observé de nombreuses fois que, en réponse à des stress, le corps réagit en sécrétant une grande quantité de certaines hormones. Pour déterminer si un stress causé par le froid avait un effet sur l'activité glucuronyl transférase, un groupe de rats était gardé à 3° pendant 12 jours et un deuxième groupe à 25°. (INSCOE et AXELROD (79)). L'essai de la capacité des microsomes, soumis au froid, à former l'ortoaminophényl glucuronide, montrait une diminution de 25 % d'activité.

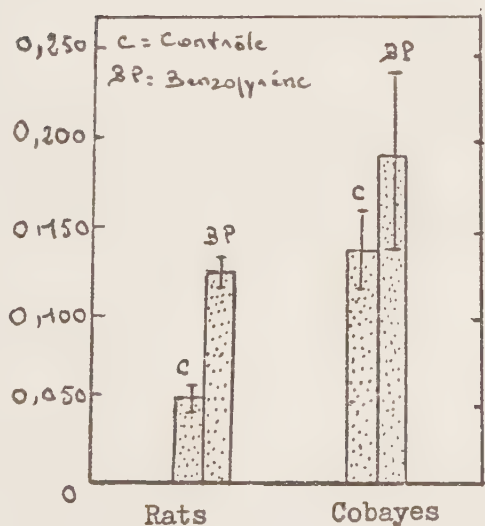
μ . M. d'O Aminophényl glucuronide
par gramme de foie sec.



Effet du benzopyrène, in vitro. (73)

Tableau 10 : donné par INQCOE et
AXELROD (73)

μ . M. d'O. Aminophényl glucuronide
par gramme de foie sec.



Effet du benzopyrène chez des animaux néo-natals, in vitro. (73)

Tableau 11 : donné par INSCOE et
AXELROD

IX - Tétrachlorure de carbone

ISSELBACHER et Mac CARTHY (83) ont montré que l'injection intrapéritonéale de C Cl 4 réduisait la capacité du foie à former des glucuronides. Ce phénomène est mesuré, in vitro, par la formation de p.n.ph. glucuronide. Pour ces auteurs, l'action du C Cl 4 sur l'activité serait quantitative plutôt que qualitative.

TAKETA (138) remarque une augmentation de la glucuronyl transférase hépatique 12 à 24 heures après l'injection tétrachlorée.

D'après VAISLER et coll. (144) le tétrachlorure diminue la conjugaison du benzoate de Na avec l'U.D.P.G.A., et, l'hormone pinéale et la vitamine B 12 protégeraient cette activité détoxifiante du foie.

Enfin, CHOJECKI et KERN (32-33) étudiant des rats atteints par une hépatite chronique au C Cl 4 montrèrent que si la glucuroconjugaison de la bilirubine est affectée par l'hépatite nutritionnelle ou au C Cl 4 celle de la phénolphtaléine n'est perturbée que par le C Cl 4. (38).

CHAPITRE VII

SOLUBILISATION et PURIFICATION

Dès 1956, ISSELBACHER (80) a tenté de solubiliser la glucuronyl transférase par différentes techniques telles que des oscillations soniques des solvants organiques ou des sels biliaires, sans succès.

HALAC et BONEVARDI (70) ont solubilisé et activé la glucuronyl transférase par action de l'EDTA.

POGELL et LELIOR en 1961 (110) ont traité de la solubilisation et de l'activation de la Glucuronyl transférase des microsomes de foie de cobaye par action de la digitonine.

La même année, ISSELBACHER, (81) modifiant la technique de IMAI et SATO (78) a solubilisé et partiellement purifié la glucuronyl transférase en utilisant des microsomes de foie de lapin traités par du venin de Trimeresurus à -15° pendant 3 à 4 semaines. Il apparaît de plus une augmentation de l'activité de la transférase qui est probablement due à la présence de B-glucuronidase qui hydrolyse le produit formé (acide paranitrophényl glucuronique) par la réaction de transfert. La purification entraînait une diminution de la stabilité de l'enzyme. ISSELBACHER a également noté que la fraction traitée par le venin avait une activité négligeable dans la synthèse des conjugués de l'acide N-glucuronique. Ceci a amené ISSELBACHER à suggérer qu'une distinction pouvait exister entre l'enzyme responsable de la synthèse des conjugués de type ether et ester de l'acide glucuronique et ceux de l'acide N-glucuronique. La question était donc posée de savoir si il existait une ou plusieurs glucuronyl transférase.

C H A P I T R E V I I I

EXISTENCE D'UN SYSTEME GLUCURONYL TRANSFERASE
+++++

Déjà en 1957, FISHMAN et GREEN (65) étudiant le transfert enzymatique du groupement glucuronyl ont émis l'hypothèse suivant laquelle certains glucuronides pouvaient être formés par transglucuronylation de glucuronides préexistant, sous l'influence d'une enzyme ressemblant à la α -glucuronidase.

En 1962, ISSELBACHER, CHARABAS et QUINN (84) reprirent cette question et montrèrent qu'il existe, peut-être, dans les microsomes de foie de lapin, un système enzymatique comprenant plusieurs glucuronyl transférase, ou au moins deux. L'une est active dans la synthèse des glucuronides ether et ester, et, elle est soluble par le traitement avec le venin ; l'autre agit dans la synthèse des conjugués de l'acide N-glucuronique, et n'est pas libérée des microsomes par la technique employée.

DUTTON, à son tour, en 1963 (48) posa la question : combien y-a-t'il de glucuronyl transférase ?

Un argument en faveur de l'existence de plusieurs enzymes fut donné par les études faites par ARIAS (3) en 1961 sur une lignée de rats ayant des jaunisses congénitales non hémolytiques. (VAN LEUSDEN, BAKKEREM, ZILLIKEN et STOLTE) (146). In vitro, l'activité de la G. T. hépatique et extrahépatique était alors diminuée avec des accepteurs comme la bilirubine et le N-acétyl paranitrophénol. Mais, ces ne pouvaient obtenir l'évidence de l'existence de deux enzymes.

En 1964, STOREY (132) montrait que le système enzymatique catalysant la réaction entre l'orthoaminophénol ou le paranitrophénol et l'acide U. D. P. glucuronique, dans les homogénats de foie de souris présentait des différences vis à vis de l'inhibition causée par les groupements thiols.

Cette constatation lui faisait envisager en 1964 et 1965 (133) la possibilité de l'existence d'une autre enzyme. En effet, la synthèse de l'orthoaminophényl glucuronide ou du paranitrophénylglucuronide dans les homogénats était inhibée par le phénol, le menthol et l'acide benzoïque qui pouvaient tous être eux-même conjugués dans les mêmes circonstances. Or, la concentration d'orthoaminophénol, augmentée, diminuait l'inhibition de la synthèse de l'orthoaminophényl glucuronide par les accepteurs de glucuronyl : phénols, menthol et acide benzoïque : mais était sans effet sur celle causée par le paranitrophénol et le triophénol. Par contre, la concentration de paranitrophénol étant augmentée, cela diminuait ou détruisait l'inhibition de la synthèse du paranitrophénylglucuronide dûe aux : phénols, menthol, acide benzoïque, acide anthranilique, ortho aminophénol et triophénol. Le système ortho aminophénol était donc beaucoup plus facilement inhibé par tous les composés que le système para nitrophénol. Et, le para nitrophénol était un inhibiteur puissant de la synthèse de l'ortho aminophénylglucuronide, sans que, dans ce cas, l'augmentation de la concentration en ortho aminophénol puisse réduire même partiellement cette inhibition.

STOREY discutait ces résultats et suggérait que les deux synthèses ne pouvaient pas être effectuées par le même système enzymatique. De même, la grande variété d'accepteurs utilisés était en faveur de l'existence d'un ou plusieurs systèmes enzymatiques. Mais, la nature labile de l'enzyme a gêné les recherches. Et STOREY, ne concluant pas, posait la question : Y-a-t'il une seule enzyme, ou une famille d'enzymes ayant des spécificités différentes pour les accepteurs ?

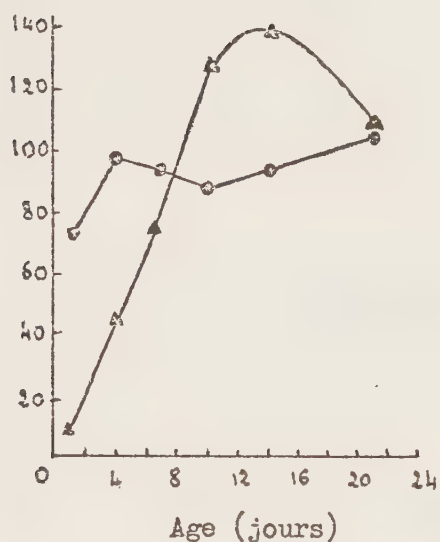


Tableau 13 : Activité de l'U.D.P.G.A. sur la bilirubine et la paranitrophénol chez le lapin (âges différents). TOMLISON et YAFFE (129).
 Δ bilirubine, ● p-nitrophénol. (foie).

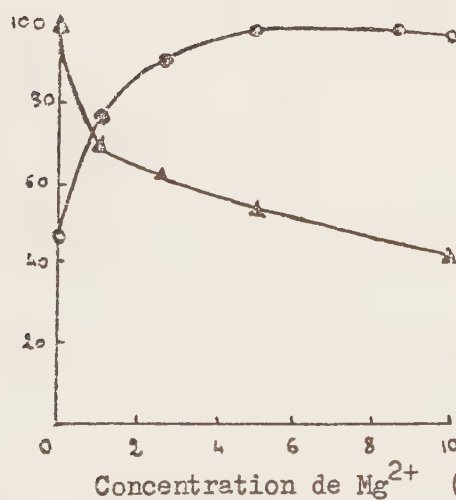


Tableau 14 : Effet de Mg^{2+} sur la formation des glucuronides de bilirubine et de p-nitrophénol chez le lapin. (129).
 ● bilirubine, Δ p-nitrophénol. (foie).

En 1966, TOMLISON et YAFFE (139) étudiant la formation des glucuronides de bilirubine et de para nitrophénol, dans le foie de lapin, ont repris les travaux déjà effectués par de nombreux chercheurs, et ont à leur tour montré, par une étude de ces deux composés, que toutes les recherches tendaient à prouver l'existence d'une famille enzymatique.

D'après ces auteurs, il y aurait plusieurs faits en faveur de cette hypothèse :

1 - Le développement de l'activité enzymatique envers le para nitrophénol suit une voie différente de celle de la bilirubine chez le jeune lapin. La conjugaison du para nitrophénol est plus élevée à la naissance et atteint plus vite l'activité adulte que ne le fait la bilirubine. (cf. courbe). De semblables résultats pour la formation de para nitrophénylglucuronide et d'ortho aminophénylglucuronide ont été notés par DUTTON (46) ; comme c'est le cas pour la synthèse du glucuronide de bilirubine, l'ortho aminophénol se conjugue plus lentement que le para nitrophénol. De même, VAN LEUSDEN et coll. (146) avaient noté que des rats Gunn, ayant une jaunisse causée probablement par une faible activité de l'enzyme nécessaire à la formation du glucuronide de bilirubine, pouvaient néanmoins conjuguer le para nitrophénol.

2 - La formation du glucuronide de bilirubine dans les microsomes de foie de lapin était stimulée par la présence de Mg^{++} sans que, dans ce cas, la conjugaison du para nitrophénol ne soit inhibée (cf. Tabl. 14). La même constatation avait été faite par STOREY en 1965 (133), et ISSELBACHER et coll. (84) avec une enzyme partiellement purifiée.

Pour TOMLISON et YAFFE (139) cela pouvait être une

manifestation de la présence de plusieurs enzymes réagissant différemment vis à vis des ions métalliques.

3 - Les variations obtenues avec des préparations d'enzyme solubilisée par le venin et utilisant comme substrat le paranitrophénol et la bilirubine. En effet, une augmentation de 300 pour cent de la conjugaison du paranitrophénol voisinait avec une perte de 80 pour cent dans la glucuronidation de la bilirubine.

4 - Enfin, le paranitrophénol est un puissant inhibiteur de la formation des glucuronides de bilirubine, comme nous l'avons déjà vu. Si la même enzyme conjugait les deux substrats, on pourrait s'attendre, d'après TOMLISON et YAFFE, à une inhibition compétitive. Or, la bilirubine ajoutée même dix fois en excès, était incapable de diminuer la conjugaison du paranitrophénol.

En conclusion, TOMLISON et YAFFE (139), tout en faisant remarquer les différences entre leurs travaux de solubilisation de l'enzyme et ceux d'ISSELBACHER (80 - 81), estimaient que ces résultats ainsi que ceux des autres laboratoires, tendaient à prouver l'existence non pas d'une enzyme spécifique, mais d'une famille d'enzymes ayant chacune sa propre spécificité vis à vis des substrats.

Après HORVATH (74) envisageant en 1966 la possibilité qu'il existe des isoenzymes de la glucuronyltransférase, HALAC et REFF (72) en 1967 sont également arrivés à envisager que la glucuroconjugaison n'était pas le fait d'une seule enzyme. Pour eux, l'utilisation des résultats obtenus avec le paranitrophénol et d'autres composés phénoliques pour tirer des conclusions sur la conjugaison de la bilirubine ne pourrait être légitime que si une seule enzyme responsable du transfert de l'acide glucuronique à différents accepteurs. Comme l'avait proposé AXELROD, INSCOE et TOMKINS (10). Or, après avoir solubilisé l'enzyme par le deosy-cholate après traitement par l'E D T A, ces auteurs ont vu que l'animal qui avait la plus grande capacité à conjuguer la bilirubine, avait la plus basse à conjuguer le paranitrophénol et vice-versa (voir tableau 15).

Par ailleurs, un foie humain examiné conjugait 12 umoles de paranitrophénol et 0,98 umoles de bilirubine en trente minutes par gramme de tissu hépatique. Mais c'est grâce à la solubilisation de l'enzyme que HALAC et REHH (72) ont apporté la

preuve de l'existence de deux Glucuronyltransférase. En effet, la centrifugation des microsomes activés, après qu'ils aient été homogénéisés dans la solution de deoxycholate, montrait que la partie active responsable de la formation du paranitrophényl glucuronide était concentré dans le "pellet" tandis que la partie responsable de la conjugaison de la bilirubine était distribuée uniformément à travers la longueur du tube à centrifuger. Ceci indiquait que l'URIDINE DIPHOSPHO GLUCURONYL TRANSFERASE, qui conjugait la bilirubine avec l'acide glucuronique, était liée à des structures qui étaient complètement détruites par la concentration de deoxycholate utilisée par ces chercheurs, tandis que la partie active envers le paranitrophénol semblait se trouver dans des structures moins sensibles à l'action du deoxycholate (voir tableau 16).

Enfin, HALAC et REFF (72) rapportaient que LEVITZ. dans une communication personnelle, leur avait signalé le cas d'un patient qui, atteint du syndrome de Najjar-Criggler, et ayant dans son serum de la bilirubine indirecte, était cependant capable d'éliminer rapidement de l'estriol sous forme de glucuronide.

Glucuronyl transféase chez différents animaux

Source de foie	Composés conjugués	
	Paranitrophénol	Bilirubine
	(μ moles conjuguées par g. de foie/10 mn)	(μ moles conjuguées par g. de foie/30 mn)
Rat (20)	5.2	1.14
Lapin (4)	15.3	0.62
Cobaye (5)	8.2	0.25

Tableau 15 : donné par HALAC et REFF (72) - UDP glucuronyltransférase chez différents animaux. Les valeurs sont moyennes et le nombre d'animaux indiqué entre parenthèses.

Distribution de l'activité de la glucuronyl transférase après centrifugation

	Bilirubine conjuguée unités/ml	Paranitrophénol conj. unités/ml	<u>Bilirubine</u> paranitrophénol
Couche supérieure	45	137	0.33
Couche du milieu	43	188	0.23
Pellet	44	480	0.09

Tableau 16 : donné par HALAC et REFF (72) - Distribution de l'activité de l'UDPglucuronyltransférase après centrifugation.

Ainsi, comme nous venons de le voir, les plus récentes recherches faites sur la Glucuronyl Transférase concordent pour donner comme une presque certitude l'existence d'un système enzymatique comprenant au moins deux enzymes de spécificité différente, quoique se chevauchant, ce qui expliquerait les résultats parfois divergents suivant les chercheurs. La question est donc posée de savoir s'il y a une, deux ou même plusieurs Glucuronyl Transférase.

C H A P I T R E V I I I

E X I S T E N C E D ' U N S Y S T E M E G L U C U R O N Y L

T R A N S F E R A S E

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

CHAPITRE PREMIER

METHODE UTILISEE

La technique est adaptée de MIETTINEN et LESKINEN (101-102).

a) - REACTIFS

Préparations tissulaires

Les organes prélevés sont homogénéisés pendant une minute avec une solution de KCl à 0,15 M. Il faut remarquer que l'U.D.P.G.T. est une enzyme très fragile. On doit donc surveiller particulièrement les prélèvements qui doivent être très rapides, l'organe étant plongé le plus rapidement possible dans la solution de KCl à zéro degré.

Milieu d'essai

Le mélange contient :

0,250 ml de para nitrophénol à 2 mM dans le tampon triéthanolamine à 0,5 M (pH = 7,5)

0,250 ml de l'U.D.P.G.A. à 2 mM

0,50 ml de l'homogénat

0,50 ml d'EDTA à 20 mM

Nous traitons simultanément : chaque essai comportant la préparation enzymatique et le substrat, puis les témoins :

T : qui ne contient ni paranitrophénol ni homogénat ;

T' : témoin de coloration contenant de l'acide tétrachloracétique ;

T'' : ne contenant pas d'homogénat et qui donne l'activité spontanée.

On incube à 37° pendant 30 minutes. Puis la réaction est stoppée par 1 ml d'acide trichloracétique à 0,26 M. On centrifuge dix minutes à 4 500 tours. On prend ensuite 1 ml de surnageant auquel on ajoute 1 ml de KOH à 0,4 M, ce qui donne la coloration jaune.

La saturation de la glucuronyl transférase est difficile à atteindre, surtout dans l'intestin, à cause de la rapide destruction de l'U.D.P.G.A. par l'U.D.P. Glucuronique pyrophosphatase. (CONNEY et BURNS en 1961 (35). L'addition de l'EDTA inhibe cette enzyme et donne une augmentation de la synthèse du glucuronide. La glucuronidation est alors maximale. Cette augmentation serait surtout sensible dans l'intestin, tandis que la glucuronidation dans la foie serait diminuée chez les femelles. Toutefois dans certains cas, l'EDTA pourrait inhiber l'action de l'enzyme.

MIETTINEN et LESKINEN (101) ont comparé la glucuronidation avec de l'EDTA et sans EDTA (voir tableau 17).

De même, HALAC et REFF (72) ont étudié longuement l'activation de la glucuronidation due à l'EDTA. Et ces auteurs ont fait remarquer que leur désaccord avec MIETTINEN venait seulement de la différence dans les temps d'incubation.

Il faut remarquer, par ailleurs, que la -glucuronidase pourrait interférer dans la réaction en détruisant le composé formé. Mais, en 1954, DUTTON et STOREY (58) ont recherché son action éventuelle et l'ont trouvée pratiquement nulle dans les conditions opératoires employées.

	P. nitrophénol conjugué Moles 10^{-3} /100 mg. poids de tissus sec/30 mn			Phosphate inorganique donné par l'U.D.P.G.A. Moles 10^{-3} /100 mg. poids de tissus sec/30 mn		
	sans EDTA	avec EDTA	différence	sans EDTA	avec EDTA	différence
Foie	45.4 32.7-57.3	64.1 48.4-76.4	18.8 5.5-26.6	266	67	198
Rein	11.4 5.5-24.5	25.5 11.6-37.5	14.2 4.8-21.8	271 160-340	101 13-340	183 93-287
Intestin	13.6 4.1-24.9	41.0 14.3-57.3	27.3 11.6-53.2	428 320-534	92 7-200	328 193-466

Tableau 17 : Effet de l'EDTA sur le p. nitrophénol et formation du phosphate inorganique par le foie, le rein et l'intestin de rat en présence d'U. D. P. G. A. (dix animaux). Tableau donné par MIETTINEN et LESKINEN (92).

Lecture de la coloration

La lecture des tubes se fait à 400 u, soit au colorimètre, soit au spectromètre.

Les résultats obtenus sont ensuite reportés sur une courbe faite à l'aide d'une gamme étalon. On obtient ainsi les pourcentages

C H A P I T R E I I

ACTIVITE DE LA GLUCURONYLTRANSFERASE

CHEZ LA SOURIS

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

1 - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Les animaux utilisés étaient des souris mâles et femelles.

Leurs âges variaient de 21 jours à 43 jours. Le poids moyen était d'environ 30 grammes.

Les animaux assommés, les organes étaient prélevés rapidement dans la solution de KCL réfrigérée ; et les homogénats étaient faits rapidement, avec un appareil Ultra-Turrax en maintenant les organes et la solution de KCL dans le réfrigérant à la température de 0 degré.

Le temps d'incubation était de 30 minutes. Une incubation de une heure ne nous a pas donné de variations sensibles.

Les dilutions utilisées étaient : au 1/10 pour le foie, au 1/5 pour les reins et l'intestin. Ce sont celles utilisées par la plupart des auteurs consultés dans la bibliographie.

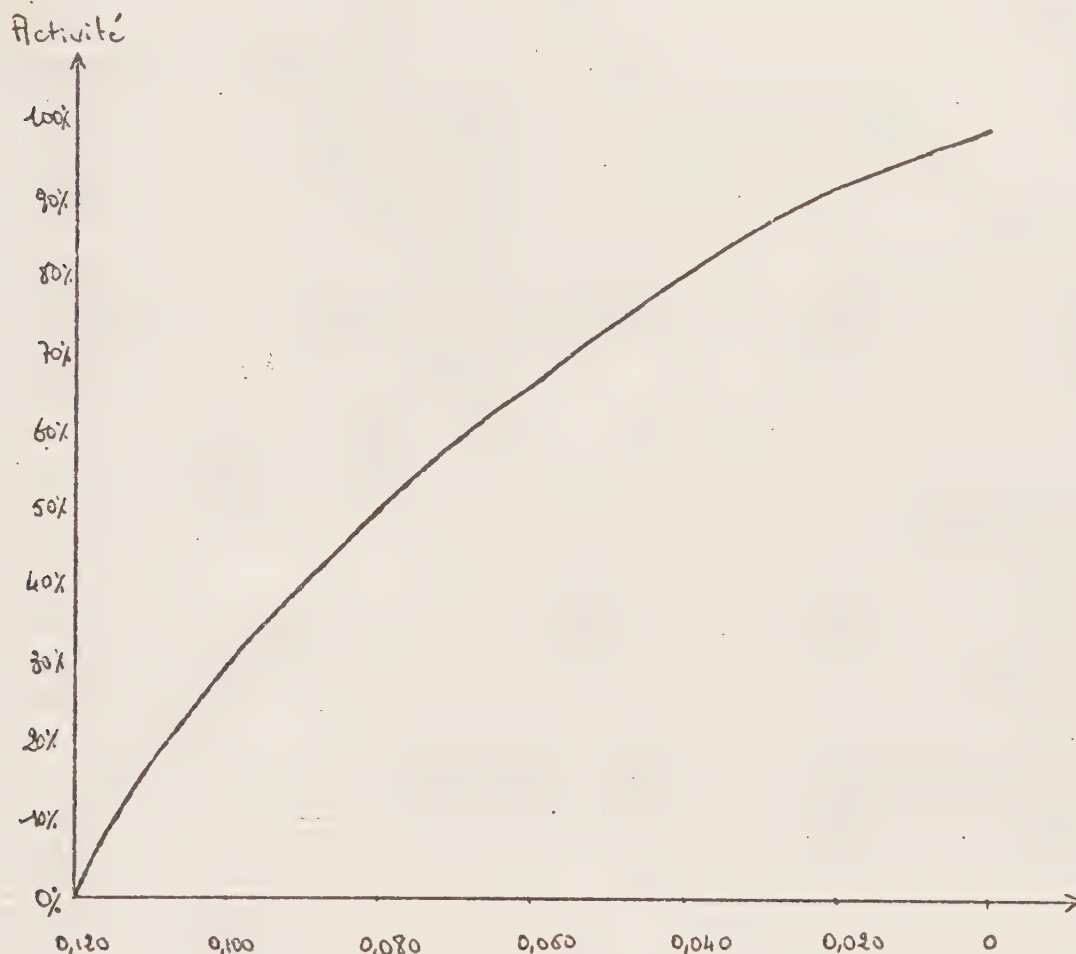
La quantité d'EDTA ajoutée était celle nous ayant donné les meilleurs résultats, soit 0,50 ml par tube.

Nous avons remarqué que, si l'addition d'EDTA donnait une augmentation de la synthèse dans le rein et le tractus intestinal, son action était contraire dans le foie et dans le cas présent.

Par ailleurs, les souris étaient tuées par choc car nous avons pu constater que l'activité enzymatique disparaissait chez des animaux tués avec de l'éther.

Nous avons dosé la Glucuronyl Transférase par la méthode décrite page 52. Les lectures ont été faites au photocolorimètre et les résultats reportés sur une courbe étalon. L'étalonnage était effectué.

A l'aide d'une série de tubes contenant respectivement : 0,250 ; 0,225 ; 0,200 ...
..... 0 ml de paranitrophénol et 2 1,750 ml d'eau distillée,
et donnant une gamme correspondant à 0,10,20, 100 pour cent de conver-
sion du substrat. (Voir courbe I et Tableau 18).



Courbe I: Obtenue au Photocolorimètre.

Activité	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	100 %
p. n. ph.	0,250	0,225	0,200	0,175	0,150	0,125	0,100	0,075	0,050	0
1	0,120	0,115	0,105	0,100	0,085	0,080	0,065	0,055	0,035	0
2	0,115	0,110	0,105	0,095	0,090	0,080	0,067	0,060	0,040	0
3	0,125	0,120	0,115	0,105	0,095	0,080	0,070	0,055	0,045	0
M	0,120	0,115	0,108	0,100	0,090	0,080	0,067	0,057	0,040	0

2 - EXPRESSIONS DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en pourcentage de substrat scindé pendant la durée d'incubation. Ainsi, par exemple, le chiffre 20 signifie que nous avons 20 p. cent de substrat métabolisé.

Sur les différents tableaux sont portées les moyennes arithmétiques des essais effectués et les écarts standards σ calculés d'après la formule suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

$\sum$ = somme

d = différence entre les résultats de chaque essai et la moyenne arithmétique des résultats pour n expériences.

n = nombre d'expériences.

Nos dosages ont porté pour la souris sur 10 séries d'essais pour les mâles et sur 5 séries d'essais pour les femelles. Nous avons condensé les résultats obtenus dans les tableaux suivants : 19, 20, 21.

MALES

1/10

FEMELLES

1/10

N°	ss EDTA	Avec EDTA	ss EDTA	Avec EDTA
1	23,0	15,0 19,0	24,0	14,0
2	28,0	24,0 24,0	22,0	13,0
3	27,0	24,0 28,0	19,0	13,0
4	20,0 23,0	14,0 16,0	23,0	13,0
5	27,0 25,0	20,0 21,0	22,0	14,1
6	21,0 19,0	14,0 16,0		
7	26,0	16,0 15,0		
8	25,0	19,0 21,0		
9	29,0	14,0 17,0		
10	23,1	15,0 18,0		
Moy.	24,3	17,5 19,5	22,0	13,0
σ	3,1	4,0 3,6	1,8	1,2

Tableau 19 : Foie de souris mâles et femelles.

Mus Musculus : INTESTIN

MÂLES

FEMELLES

N°	ss EDTA	Avec EDTA	-ss EDTA	Avec EDTA
1	4,0	15,0 16,0	3,0	12,0 15,0
2	3,0	13,0 15,0	3,0	11,0 13,0
3	3,0	18,0 20,0	4,0	13,1 15,0
4	6,1	14,0 17,0	2,1	12,0 14,1
5	4,0	19,0 17,0	3,0	10,0 12,0
6	2,0	15,0 18,0		
7	3,0	14,0 16,0		
8	5,0	15,0 17,0		
9	2,0	13,0 15,0		
10	3,0	12,0 13,0		
Moy.	3,5	15,6	3,0	12,7
σ	1,2	2,0	0,2	1,6

Tableau 20 : Intestin de souris mâles et femelles

MALES

FEMELLES

N°	ss EDTA	Avec EDTA	ss EDTA	Avec EDTA
1	2,0	11,0	3,0	10,0
2	1,0	16,0	1,0	9,0
3	2,0	15,0	0	8,0
4	5,0	14,0	5,0	9,0
5	2,0	12,0	2,0	10,1
6	3,0	10,1		
7	3,1	13,0		
8	2,0	12,0		
9	4,0	13,0		
10	3,0	14,0		
Moy.	2,8	13,5	1,6	10,2
	1,1	2,3	1,1	1,3

Tableau 21 : Reins de souris Mâles et Femelles

C H A P I T R E I I I

ACTIVITE DE LA GLUCURONYLTRANSFERASE

CHEZ VIPERA ASPIS

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

1 - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Nous avons utilisé des vipères de sexe mâle ou femelle. Les organes ont été prélevés immédiatement après la mort de l'animal obtenue par section de la tête. Les dilutions étaient les mêmes, pour le foie, les reins et l'intestin, soit au 1/5 et au 1/10.

2 - RESULTATS

Les résultats de nos expériences, qui ont porté sur une dizaine d'animaux répartis en trois séries d'essais, ont été négatifs dans tous les cas de notre expérimentation.

C H A P I T R E I V

=====

ACTIVITE DE LA GLUCURONYL TRANSFERASE

CHEZ TINCA TINCA

_o_o_o_o_o_o_o_o_o

1 - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Nous avons utilisé des tanches sacrifiées par choc puis rupture de l'arête dorsale. Les homogénats étaient réalisés de la même façon que pour la souris et Vipera aspis. Les organes prélevés étaient dans ce cas : le foie et l'intestin.

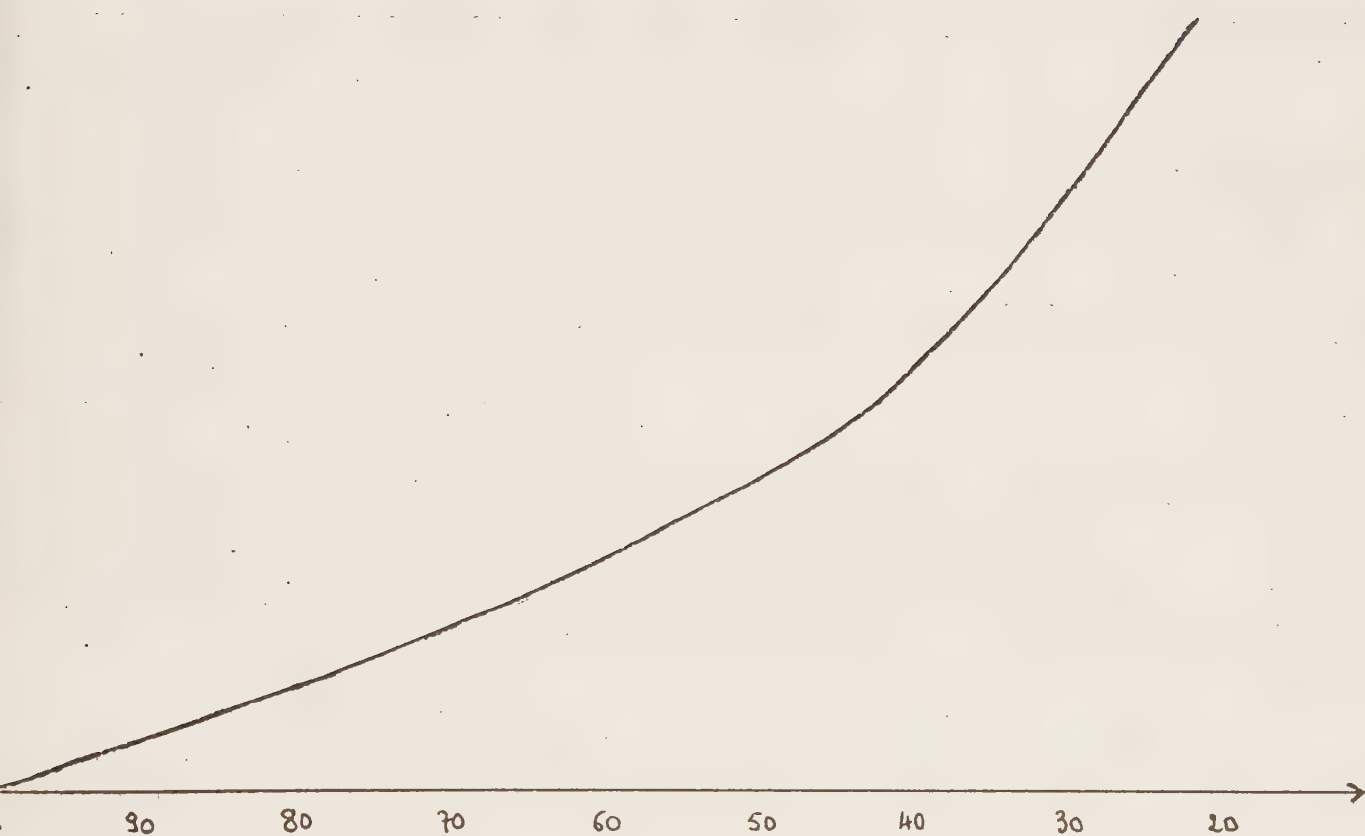
Les dilutions étaient les mêmes, sauf pour le foie, où nous avons utilisé des dilutions au 1/10, 1/20.

2 - RESULTATS

Dans ce cas, ainsi que pour les expériences suivantes, la lecture a été faite au Spectrophotomètre ZEISS ; ceci nous a amené à faire une nouvelle gamme étalon en diminuant la concentration en paranitrophénol pour avoir une lecture suffisamment précise. Les tubes étalons contenaient : 0,050 ; 0,045 0 de paranitrophénol et 1,950 ; 1,955 2 ml d'eau distillée (voir la courbe II et le tableau 22). La longueur d'onde employée était également 400 m μ .

Courbe II

• Courbe du Spectrophotomètre.



Gamme étalon pour le spectromètre

Tableau 22 : Etalonnage du Spectrophotomètre.

Activité	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100%
p.n.ph.	0,050	0,045	0,040	0,035	0,030	0,025	0,020	0,015	0,010	0,005	0
1	21	24,5	28	32	33	36	49,5	61	71,5	81	100
2	22	25	31,5	38	40	41,5	51,5	61,5	67	82,5	100
3	21,5	26	29,5	36,5	39	41	50	60	72,5	80	100
4	22	27,5	31	32	38	51	53	58,5	70	86	100
Moy.	22	26	30	34,5	37	42,5	51	60	70	82,5	100

Nos moyennes ont porté sur 7 séries d'essais effectués sur des organes prélevés dès la mort de l'animal. Par ailleurs, nous avons aussi travaillé sur des organes conservés pendant un certain temps (10 à 15 jours) dans un congélateur à -24° .

Les résultats sont condensés dans les tableaux suivant. Il apparait une légère diminution de l'activité de la G. T. dans les organes congelés. (Tableau 23).

N°	Sans EDTA 1/10	Avec EDTA			Sans EDTA 1/10	Avec EDTA 1/10
		1/10	1/20	1/10		
1	17,0	34,0	25,0	11,0	22,0	22,0
2	17,0	25,0	19,0	7,0	20,0	19,0
3	22,0	31,0	24,0	9,0	17,0	21,0
4	20,0	33,0	25,0	8,0	22,0	18,0
5	25,0	28,0	21,0	5,0	22,0	23,0
6	15,0	24,0	16,0	8,0	16,0	15,0
7	13,0	25,0	18,0	4,0	18,0	14,0
8						
9						
10						
May.	14,8	29,6	21,1	7,4	19,2	19,2
	4,1	4,5	3,6	2,5	2,8	2,8

Tableau 23 : Foie et Intestin - Inca Tinka

C H A P I T R E V

ACTIVITE DE LA GLUCURONYLTRANSFERASE

CHEZ HELIX POMATIA

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

1 - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Nous avons utilisé des escargots maintenus en chambre froide entre - 2° et - 4°, dans le but d'éviter la mortalité (BASTIDE 1954) (13). Pour le prélèvement de l'hépatopancréas, nous avons suivi la technique de GIAJA (67) et celle de JULIEN (88), utilisée par BASTIDE en 1954. Nous avons fait une première dilution au 1/10, très colorée, à partir de laquelle nous avons obtenu des dilutions au 1/50, 1/100 et 1/200 qui sont alors utilisables pour une bonne lecture au spectrophotomètre.

2 - RESULTATS

Les résultats sont donnés en pourcentage de paranitrophénol métabolisé. Nos moyennes ont porté sur dix séries d'essais et les résultats sont condensés dans les tableaux suivants (24).

La lecture a été faite au spectro. Nos expériences ont été faites uniquement sur l'hépatopancréas.

ESCARGOT : Hépato Pancréas

1/50

1/100

1/200

N°	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
1	0	38,0	13,0	42,0	3,0	19,0
2	0	29,0	6,0	37,0	0	14,0
3	0	28,0	27,0	29,0	31,0	
4	0	30,0	30,0	34,0	38,0	16,0
5	0	39,0	5,0	42,0	0	18,0
6	0	40,0	10,0	43,0		
7	0	33,0	30,0	35,0	36,0	
8	0	38,0	11,0	43,0	2,0	20,0
9	0	31,0	8,0	34,0	39,0	
10	0	33,0	12,0	37,0		
Moy.	0	32,8	8,6	37,1	1,0	18,1
	0	4,3	2,9	4,1	0,3	2,8

Tableau 24 : Hépato Pancréas d'ESCARGOT.

CHAPITRE VI

ACTIVITE DE LA GLUCURONYL TRANSFERASE CHEZ

COTHURNIX COTHURNIX JAPONICA

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

1 - OBTENTION DES PREPARATION ENZYMATIQUES

Nous avons utilisé des caillies femelles ayant environ un an. Les animaux étaient sacrifiés par section de la tête. Les organes prélevés étaient dans ce cas, le foie, les reins et la partie antérieure de l'intestin. Les dilutions étaient pour le foie : 1/10, 1/20 et 1/50 ; et pour les reins et l'intestin au 1/5 et 1/10.

2 RESULTATS

Nos moyennes ont porté sur 15 animaux répartis en 6 séries d'essais, et les résultats, exprimés comme dans les autres cas, sont condensés dans les tableaux suivants (Tableau 25).

Des essais faits avec une dose d'EDTA 2 fois plus forte n'ont donné aucun changement.

COTHURNIXFOIEINTESTINREINS

N°	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
1	0	13,0	0	12,0	0	17,0
2	2,0	12,0	0	11,0	0	14,0
3	1,0	13,0	0	9,0	2,0	16,0
4	0	10,0	0	14,0	0	21,0
5	0	15,0	0	15,0	3,0	22,0
6	0	20,0	0	11,0	0	14,0
Moy.	0	14,1	0	11,4	0,8	16,5
	0	2,8	0	2,0		3,3

Tableau 2 : Foie, Reins et Intestin de COTHURNIX SAPONICA

CHAPTER VII

ACTIVITE DE LA GLUCURONYLTRANSFERASE CHEZ RANA ESCULENTA

☐ none ☐ some ☐ much ☐ many ☐ all

1 - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Nous avons utilisé des grenouilles mâle d'un poids moyen d'environ 50 grammes. Les animaux étant assommés et tués, les organes prélevés immédiatement étaient : le foie, l'intestin, les reins. Un petit nombre d'expériences faites sur des organes conservés 15 jours au congélateur ne nous ont permis de noter de différences sensibles.

2 - RESULTATS

Nos moyennes ont porté sur une vingtaine d'animaux sur lesquels étaient seulement prélevés deux organes à la fois.

Les résultats exprimés comme dans les autres cas, sont condensés dans les tableaux suivants (tableau 26).

RANA EXCULENTA

N°	<u>FOIE</u>		<u>1/20</u>		<u>INTESTINS</u> 1/10		<u>REINS</u>	
	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
1	2,0	17,0	0	27,0	0	10,0	0	29,0
2	0	14,0	0	25,0	0	13,0	0	26,0
3	0	13,0		20,0	0	16,0	0	32,0
4	1,0	16,5	0	21,0	0	19,0	0	19,0
5	0	21,0	0	19,0	0	17,0	0	27,0
6	0	15,0	0	22,0	0	15,0	0	29,0
7	0	19,0	0	25,0	0	17,0	0	22,0
8	0	17,0	0	26,5	0	13,0	0	30,0
9	0	22,0	0	29,0	0	20,5	0	25,0
10	0	14,0	0	26,0	0	15,0	0	27,0
Moy.	0	16,8	0	24,0	0	15,5	0	26,6
	0	3,0	0	3,3	0	3,0	0	

Tableau 26 : Foie, Reins, Intestins de RANA EXCULENTA

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

1) En ce qui concerne la partie biliographique, nous avons pu constater que les études sur la G. T. sont assez récentes. Toutefois, de nombreux auteurs ont étudié la glucuroconjugaison et ont vu l'importance de cette enzyme. En particulier, il faut noter le très grand rôle que joue la G. T. dans les phénomènes de métabolisme médicamenteux, et surtout, dans l'immaturité enzymatique du nouveau-né. En effet, pour certains auteurs, les ictères de la période néo-natale seraient liés à une déficience en glucuronyl transférase entraînant une accumulation de bilirubine non conjuguée.

A l'heure actuelle, la question est de savoir avec certitude si l'on se trouve en présence d'une seule enzyme qui agirait dans de nombreuses réactions, ou s'il s'agit d'une famille d'enzymes ayant chacune sa propre spécificité vis-à-vis des différents substrats. Cette hypothèse semble maintenant confirmée grâce aux résultats obtenus dans la solubilisation de l'enzyme qui fait apparaître l'existence d'au moins deux systèmes enzymatiques (HALAC et REFF (72), mais surtout grâce aux travaux de TOMLISON et YAFFE (139). Ces auteurs ont en effet montré de nettes différences dans l'activité de l'enzyme vis-à-vis du para nitrophénol et de la bilirubine. La question reste posée pour savoir : combien existe-t-il d'enzymes dans cette famille et s'il y a des isoenzymes.

2) Du point de vue expérimental, les faits les plus importants semble-t-il, à relever, sont les suivants :

			Moyennes		σ	
			Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
Souris	Foie	mâles	24,3	17,5 - 19,5	3,1	4,0 - 3,6
		femelles	22	22 13		1,8
	Intestin	mâles	3,5	15,6	1,2	2,0
		femelles	3,0	12,7	0,2	1,6
	Reins	mâles	2,8	13,5	1,1	2,3
		femelles	1,6	10,2	1,1	1,3
Tigra	Foie	1/10	18,4	29,6	4,1	4,5
		1/20		21,1		3,6
		1/20		11,7		1,9
	Intestin	1/20	7,4	19,2	2,5	2,8
Escargot	Hépatop.	1/50	7	32,8	0	4,3
		1/100	8,6	37,1	2,9	4,1
		1/200	1,0	18,1	0,3	2,8
Cochon d'Inde	Foie	1/10	0	14,1	0	2,8
	Intestin	1/10	0	11,4	0	2,0
	Reins	1/10	0,8	16,5		3,3
Rat	Foie	1/10	0	16,8	0	3,0
		1/20	0	24,0	0	3,3
	Reins	1/10	0	26,6	0	3,9
	Intestin	1/10	0	15,5	0	3,0

Tableau 27 : Tableau récapitulatif des Moyennes et des écarts types.

a) En ce qui concerne la préparation des milieux enzymatiques : l'extrême fragilité de l'enzyme qui nécessite de nombreuses précautions pour les prélèvements d'organes. L'expérience nous a en effet montré que la G.T. perdait son activité dans des organes prélevés trop lentement ou mis dans une solution de K Cl dont la température n'était pas suffisamment basse.

b) Pour ce qui est des espèces, il faut noter l'absence d'activité G.T. dans nos expériences sur VIPERA ASPIS. Nous ferons remarquer que ce manque d'activité peut peut-être s'expliquer par le fait que ces animaux avaient été conservés vivants, mais à jeun en chambre froide à 4°.

c) En ce qui concerne les activités des organes prélevés, nous constatons dans l'ensemble une activité plus importante dans le foie, excepté pour RANA ESCULENTA et pour COTHURNIX JAPONICA. En effet, pour ces deux espèces, une légère augmentation de l'activité était trouvée dans les reins par rapport au foie : 26,6 pour les reins de Rana Esculenta par rapport au foie 16,8 et 16,5 pour les reins de Cothurnix Japonica par rapport au foie 14,1.

d) Enfin il faut noter l'importance du rôle de l'E.D.T.A. qui inhibe l'U.D.P. glucuronique pyrophosphatase et donne une augmentation de la synthèse du glucuronide. MIETTINEN et LESKINEN (102) ont étudié ce rôle de l'E.D.T.A. et ont montré que dans certains cas cette action pouvait être inverse. C'est ce que nous avons remarqué chez la souris où la glucuronidation est diminuée dans le foie par l'E.D.T.A. particulièrement chez les femelles. On a les valeurs suivantes : sans E.D.T.A. 24,0 et avec E.D.T.A. 14,0.

En définitive, nous espérons avoir apporté quelques précisions qui contribueront peut-être à une meilleure connaissance d'une famille d'enzymes clef de la glucuroconjugaison, dont l'étude expérimentale est encore loin d'être terminée.

Vu le Président de Thèse.
Clermont-Ferrand, le 22 novembre 1968

Vu et permis d'imprimer
N° Ph 7/68

G. Bantegue

Clermont-F. le 2 Décembre 1968
Le Doyen de la Faculté N. & L. de
Médecine et de Pharmacie

G. MEYNIER

- TABLE DES MATIERES -

Introduction

Première partie : Recherches Bibliographiques

Chapitre I	Généralités
II	Lieu de formation des conjugués glucuroniques dans l'organisme.
III	Technique de dosage
IV	Rôle de la G. T.
V	Répartition de la G. T.
VI	Nature et propriétés de la G. T.
VII	Solubilisation et Purification
VIII	Existence d'un système G. T.

Deuxième partie : Recherches Expérimentales

Chapitre I	Méthode utilisée
II	Activité de la G. T. chez MUS MUSCULUS
III	" " " " VIPERA ASPIS
IV	" " " " TINCA VULGARIS
V	" " " " HELIX POMATIA
VI	" " " " COTHURNIX-JAPONICA
VII	" " " " RANA ESCULENTA

Résumé et Conclusions générales

- B I B L I O G R A P H I E -

- 1 - ADAMSONS K. et JOELSSON I. Amer. J. Obstetrics Gynecol. 1966, 96, n° 3 p. 437
- 2 - ARIAS I.M. - Advances in Clin.Chem. - 1960, 3, p. 35
- 3 - ARIAS I.M. - Biochem. Biophys. Research Commun. - 1961, 6, p. 81
- 4 - ARIAS I.M. - GARTNER L.M. et SEIFTER S. - Proc. Int. Hormonal steroids, 2nd Milan 1966, Pub. 1967 p. 570-5.
- 5 - ARIAS I.M. - GARTNER, SEIFTER, FURMAN - Journal of clinical Investigation - 1964, v. 43, n° 11
- 6 - ARIAS, JOHNSON, L. et WOLFSON - Clinical Research - 1960, 8, p. 28
- ARIAS I.M. et LONDON I.M. - Science - 1957, 126, p. 563
- 8 - AXELROD - J. Biol. Chem. - 1958, 232, p. 835
- 9 - AXELROD J. et INSCOE J.K. - Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. - 1960, 103, p. 675
- 10 - AXELROD J., INSCOE J.K. et TOMKINS J.M. - J. Biol. Chem. - 1958, 232, p. 538
- 11 - BALDWIN B.C., ROBINSON D. et WILLIAMS R.T. - Biochem. J. - 1960, 76, p. 595-600
- 12 - BARBARA Jones - Pediatrics - 1967, 40 (6) p. 993-9
- 13 - BASTIDE P. - Ann. Biol. Clinique - 1954, 12, p. 586
- 14 - BASTIDE P. et DASTUGUE G. - Produits et Problèmes Pharmaceutiques - Juillet 1964, 19, (7).
- 15 - BILLING B.M., COLE G.G., LATHE G.H. - Brit. M. J. - 1954, II, p. 1263
- 16 - BILLING B.M., MAGGIORE Q. et CARTER M.A. - Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1963, III, p. 319
- 17 - BOERTH R.C., BLATT A.H. et SPRATT J.L. - J. Lab. Clin. Med. - 1965, 65, p. 475
- 18 - BOLLET A.J., GOODWIN, BROWN - J. Clin. Invest. - 1959, 38, p. 451-55
- 19 - BORRELL S. - Biochem. J. - 1959, 70, p. 727
- 20 - BRODIE B.B. et MAICKEL R.P. - First Int. Pharmac. Meet - 1961, Vol. 6, P. 319
- 21 - BROWN A.K. et ZUELDER W.W. et BURNETT H. A. - J. of Clin. Invest. - 1958, 37
n° 3, p. 332-340
- 22 - BRULE, GARBAN, AMER - Presse med. - 1925, 51, p. 862
- 23 - BURNS J.J. - Amer. J. Med. - 1959, 26, p. 740
- 24 - CAILLE E. - Thèse pour le doctorat en méd. - Paris 1921
- 25 - CARBONE J.V. et GRODSKY G.M. - Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. - 1957, 94, p. 461
- 26 - CHAPTAL J., JEAN R., BONNET H. - Ann. de Pédiatrie - 2 Février 1964, 40, n° 61
- 27 - CHASSAGNE P., GEORGES, JANET L. - Thérapie - 1961, XVI, p. 579-597
- 28 - CHEMANA R., E.E. BAULIEU, O. CREPY, M.F. FAYLE - Compt. Rend. Soc. Biol. - 1957
151 n° 3, p. 452
- 29 - CHEVREL B. et CHEVREL J.P. - Presse méd. - 1966, 74, n° 34

- 30 - CHILD B., SIDBURY J.B. et MIGEON C.J. -Pediatrics- 1959, 23, p. 903
- 31 - CHIRAY M. et CAILLE E. -Soc. Med. des Hop.- Paris 18 mars 1921, p. 385
- 32 - CHOJECKI Z. et KERN F. -Gastroenterology- 1961, 40, p. 521-531
- 33 - CHOJECKI J. et KERN F. -Pol. Arch. Med. Wewnet- 1961, 31, p. 147-160
- 34 - COHN GL et BOUDY -J. Biol. Chem.- 1959, 234, p. 31
- 35 - CONNEY A.H. et BURNS J.J. -Biochimica and Biology Acta- 1961, 54, p. 369
- 36 - COTTE J., MATHIEUM, J.P. ANDRE & COLLOMBEL -Rev. Fra. c. Etudes Clin. et Biol.- 1968, XIII, p. 629-631
- 37 - DAHNK. et BREUER H. -Biochimica Biophys. Acta- 1966, 128, p. 306
- 38 - DASTUGUE G. et GREZE G. - Publication sous presse-.
- 39 - DOUDOROFF M., HASSID W.Z. et BARKER H.A. -J. Biol. Chem.- 1947, 168, p. 725
- 40 - DUCCI H. et WATSON C.J. -J. Lab. and Clin. Med.- 1945, 30, p. 293
- 41 - DUTTON G.J. -Biochem. J.- 1955, 60, XIX.
- 42 - DUTTON G.J. -Biochem. J.- 1956, 64, p. 693
- 43 - DUTTON G.J. -Biochem. J.- 1958, 69, p. 39
- 44 - DUTTON G.J. -Biochem. J.- 1959, 71, p. 141
- 45 - DUTTON G.J. -Biochem. J.- 1961, 80, p. 2
- 46 - DUTTON G. J. -Biochem. Pharmacol.- 1961, 6, p. 65
- 47 - DUTTONG. J. -First Int. Pharmacol. Meet.- 1961, 6, p. 39-45
- 48 - DUTTON G.J. -Ann. N.Y. Acad. Sci.- 1963, vol. III, p. 259
- 49 - DUTTON G.J. -et DUNCAN A.M.- Biochem. J. 1960, 77, p. 18
- 50 - DUTTON G.J. et GREIG -Biochem. J.- 1957, 66, p. 52
- 51 - DUTTON G.J., LANGELAAN D.E. et ROSS P.E. -Biochem. J.- 1964, 93, p. 4
- 52 - DUTTON G.J. et MONTGOMERY -Biochem. J.- 1958, 70, p. 17
- 53 - DUTTON G.J. et SPENCER J.H. -Biochem. J.- 1956, 63, p. 8
- 54 - DUTTON G.J. et STEVENSON I.H. -Bioch. et Biophys. Acta. -1959, 31, p. 569
- 55 - DUTTON G.J., STEVENSON, et BULLOCK M.S. -Proc. Vth Int. Congr. Biochem Moscow- 1961
- 56 - DUTTON G.J. et STOREY I.D.E. -Biochem. J.- 1951, T. 48, XXIX
- 57 - DUTTON G.J. et STOREY I.D.E. -Biochem. J.- 1953, 53, XXXVI
- 58 - DUTTON G.J. et STOREY I.D.E. Biochem. J. - 1954, 57; p. 275-283
- 59 - DUTTON G.J. et STOREY I.D.E. -Méthods in Enzymology- 1962, V, p. 159-164
- 60 - DUTTON G. J. et VIVIAN KO -Biochem. J.- 1966, 99.

- 61 - ELLIS et NEWCOMB - Proc Soc Exp Biol - 1964 , 116 p. 613- 17
- 62 - EMBDEN - Form. Beitr. Chem. Physiol. n. Pathol. - 1902, 2, p. 591.
- 63 - FISHAM - The J. of Biol. Chem. - 1955, 215, p. 527-537.
- 64 - FISHAM - Adv. Enzy. - 1955, 16, p. 361.
- 65 - FISHAM et GREEN - J. Biol. Chem. - 1957, 225, p. 435
- 66 - FREOUX - Thèse doctorat en pharmacie - Paris 1914.
- 67 - GIAJA - Thèse Doct. Sciences - Paris 1909 p. 259.
- 68 - INSBURG, WEISSBACH, MAXWELL - Biochem. Biophys Acta. - 1958, 28 p. 649
- 69 - RODSKY et CARBONE - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1958, 97, p. 291-294.
J. Biol. Chem. - 1957, 226, p. 449-458.
- 70 - HALAC E. et BONEVARDI E. - Biochim. Biophys. Acta - 1963, 67, p. 498.
- 71 - HALAC E. Jr et FRANKS S. - Biochem. Biophys. Res. Commu. - 1960, 2, p. 379.
- 72 - HALAC E. et REFF J.R. et A. - Biochim. et Biophys. Acta. - 1967, 139, p. 328-343.
- 73 - HARTIOLA K.J.V. - Ann. Med. Exp. Fenn. - 1955, 33, p. 239.
- 74 - HORVATH (Genève) - Médecine et Hygiène - 1966, N° 751, p. 1 016.
- 75 - HURLBERT R.B. et Potter V.R. - J. Biol. Chem. - 1954, 209, P. 1.
- 76 - HUTCHINSON A., ROY C. et TOWERS GH.N. - Nature. Lond. - 1958, 181, p. 841.
- 77 - HUTTUNEN et MIETTINEN - Acta Physiol. Scand. - 1965, 63, p. 133- 140.
- 78 - IMAI Y. et SATO R. - Biochim. Biophys. Acta. - 1960, 42, p. 164.
- 79 - INSCOE J.K. et AXELROD - J. Pharm. Exptl. Thérap. - 1960, 129, p. 128-133.
- 80 - ISSELBACHER K. - Recent Progeess in Hormones Res - N. Y. Vol. 12. 1956,p. 134.
- 81 - ISSELBACHER K.J. - Biochem. and Biophys. Res. Commu. - 1961, V.5 n° 4, p, 243.
- 82 - ISSELBACHER K. - et AXELROD J. J. Amer. Chem. Soc. - 1955, 77, p. 1070-1071.
- 83 - ISSELBACHER K.J. Mac CARTHY - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 1960, 103 p. 819.
J. Clin. Invest. - 1959, 38, p; 645-651.
- 84 - ISSELBACHER K.J. CHABAS M.P. et QUINN R.C. - J. of Biological Chem-
1962, 237 (4) p. 3033.
- 85 - JERVIS G.A. - Arch. of Neurology - 1959, 81, p. 55.
- 86 - JOHNSON, SARMIENOF, BLANC, DAY, - Amer. J. Dis. Child. - 1959, 97, p. 591
- 87 - JOHNSON L. et COLL. - J Dis Child - 1961, 101, p. 322.
- 88 - JULIEN - Travaux Pratiques de Physiol. Paris 1935. P; 245-46.
- 89 - KARUNAIRATNAM, LYNDIA M.H. KERR, LEWY G.A. - Biochim J. - 1949, 45, p. 496.
- 90 - LATHE G.H. - Clinical Chemistry - 1965 , 2, p. 309.
- 91 - LATHE G.H. et WALKER M - Biochem. J. - 1957, 67, p. 9
- 92 - LATHE G H. et WALKER M. - Biochem. J. - 1958, 70, P 705.
- 93 - LATHE G H. et RUTHERVEN C.R.J - J. Clin. Path. - 1958, 11, p. 155.

- 94 - LEWY et STOREY -Biochem.J.- 1949, 44, p. 295-299.
- 95 - LIPSCHITS W.L. et BUILDING E. -J.Biol.Chem.- 1939, 129, p. 333.
- 96 - LOKIETZH, DOWBEN R.M., YUNGHSIAD Y. -Pédiatries.Juillet 1963,
88 n°1, p. 47-51.
- 97 - MAICKEL R.P., JONDORF W.R. et BRODIE B.B. -Federation Proceedings-
1958, 17, p. 390.
- 98 - MARSH C. A. -Biochem.Biophys.Acta.- 1960, 41, p. 359.
- 99 - MENKEN, BARRET, BERLIN. -Clinica Chimica Acta - 1966, V.14, n°6,P.777.
- 100 - METGE et OWEN. - J.Lab.Clin.Med. - 1964, 64 (1), p.88-89, et 61,p. 335.
- 101 - MIETTINEN et LESKINEN -Biochem Pharmacol.- 1963, 12(6), . 565.
- 102 - MIETTINEN T.A. et LESKINEN -Ann.Med.Exp.Fenn.- 1962,40,p.427.
- 103 - MIWA T., TAKANO K. et FURUTANI S. -Proceedings Japan Academy-
1949,25,p.111-15
- 104 - MUNCH, PETERSEN A., KALCKAR H.M., CUTOLO E. et SMITH E.E.B.-
Nature, Lond.- 1953,172,p.1036.
- 105 - NELSON D.H. et SAMUELS -J.Clin.Endocr.Metabo.- 1952,12,p.519.
- 106 - NESSMAN C. -Thèse doct.Med.- 1960,Strasbourg.
- 107 - NEWCOMER W.S. et HENINGER R.W. -Proc.Soc Exp.Biol.N.Y. -1960, 105,
p. 32.
- 108 - PERONA G., FREZZA M. et Coll. -Clin.Chim.Acta.- 1964, 10, p.485.
- 109 - PICK -Arch.Exp.Pathol.n.Pharmacol.- 1894, t.33,p.315.
- 110 - POGELI et LELOIR -J.Biol.Chem.- 1961, 236, p.293.
- 111 - POHL - Arch.Exper.Pathol.- 1898, 41, p. 97.
- 112 - POTTER V.R., PARDEE, LYLE. -J.Biol.Chem.- 1948, 176, p. 1075.
- 113 - RABATE M.J. -Bull.Soc.Chim.Biol.- 1935, 17, p. 572.
- 114 - RITCHER D. -Brit.Med.Bull.- 1961, 17, p. 118-121.
- 115 - ROUQUES L. -Notes de médecine pratique et de Thérapie.-
- 116 - SCHACHTER D., KASS D. et LANNON T.S. -J.Biol.Chem.- 1959,234,p.201.
- 117 - SCHMID F. -Ann. de Med.- 1923, t. 13, n° 4.
- 118 - SCHMID E. -C.R. et Mémoires de la Soc. de Biol.- 1936,123,p.223.
- 119 - SCHMID R. -J.Lab.Clin.Med.- 1956, 48, p. 940.
- 120 - SCHMID -J.Biol.Chem.- 1957, 229, p. 881.

- 121 - SCHMID R., AXELROD J., HAMMAKER L. et SWARM R.L. -J.Clin.Invest.- 1958, 37, p. 1 123.
- 122 - SCHMID R., HAMMADER L. et AXELROD. -Arch.Biochem.et Biophys - 1957, 70, p. 285.
- 123 - SCHMID R. et LESTER R. -Glucuronic Acid.- 1966, p. 493-506.
- 124 - SCHMIEDEBERG et MEYER. -Zeitschrift für Physiол.Chemie- 1879,3,p.432.
- 125 - SHIRAI et OHKUBO. -J.Biochem.- 1954, Tokyo, 41, p. 341.
- 126 - SHUSTER L. -Annu.Rev.Biochem.- 1964, 33, p. 571.
- 127 - SMITH E.E.B. et MILLS G.T. -Biochim.Biophys.Acta.- 1954,13,p.386.
- 128 - SNEDECOR G.W. -Statistical Methods.- Iowa State College.- Presse Amer. 1949.
- 129 - STEVENSON I.H. et DUTTON G.J. -Biochem.J.- 1960, 77, p. 19.
- 130 - STEVENSON I.H. et DUTTON G.J. -Biochem.J.- 1962,82,P.330-340.
- 131 - STOREY I.D.E. -Biochem.J.- 1950, 47, p. 212-222.
- 132 - STOREY I.D.E. -Biochem.J.- 1964, 90, p. 15-16.
- 133 - STOREY I.D.E. -Biochem.J.- 1965, 95(1), p. 201, 1964,90,p.15.
- 134 - STOREY et DUTTON. -Biochem.J.- 1955, 59, p. 279.
- 135 - STROMINGER J.L., MAXWELL E.S., AXELROD, KALCKAR. -J.Biol.Chem.- 1957, 224, p. 79.
- 136 - TAKEMORI A.E. -J.Pharmacol.Rxp.Ther.- 1960, 130, p. 370.
- 137 - TAKEMORI A.E. et GLOWACKI O.A. -J.Pharmacol.Exp.Ther.- 1962,II,p.867.
- 138 - TAKETA K. -Acta Med.Okayanna.- 1962, 16, p. 99-101.
- 139 - TOMLISON G.A. et YAFFE S.Y. -Biochem.J.- 1966, 99, p. 507-511.
- 140 - TOUSTER C., HOLLMANN S., PINEDA C., SHUMAKER S. -First Int. Pharmacol. Meet.- 1961, 6, p. 47.
- 141 - TOUSTER O. et HOLLMANN S. -Biochimica et Biophysica Acta.- 1962, 62, p.338.
- 142 - TRIVELLONI S.C. -Arch.Biochem.Biophys.- 1960, 89, p. 149.
- 143 - TSUYUKI H., VIOLET M., CHANG et IDLER D.R. -Canadian J.Biochem. and Physiол.- 1958, 36, p. 465.
- 144 - VAISLER L., COSTINER E., BIENER J. -Rev.Sci.Med.,Acad.,Rep.Pop. Roumaine.- 1963, 8(3-4), p. 189-192.

145 - VAN LEUSDEN. - Bull.Soc.Roy.Belge Gyneco.Obstetr.- 1964, 34(1), p.14-15.

146 - VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN, STOLTE. - Biochem.Biophys.Res.

Commu.- 1962, 7, p. 67.

147 - VEST. - Arch. of Dis. in Child.- London 1958, 33(171), p. 473.

148 - VIVIAN K. O. NEMETH. - Biochem.J.- 1966, 100(2), p. 27.

149 - WERDER et YAFFE. - 1964.

150 - WOLFE H.J. et HUANG K.C. - J.Cell.Comp.Physiol.- 1959, 54, p.243.

151 - YASUTAKE, YAMAMOTO. - Naika Hokan.- 1963, 10(5), p. 225-34.

152 - ZINI F. - Spérimentale.- 1952, 102, p. 40.

